BLEOMİSİN ETOPOSİD CİS-PLATİN TEDAVİSİ UYGULANAN SIÇAN MODELLEMESİNDE OLUŞAN SPERM DNA FRAGMANTASYONUNA GLUTATYONUN ETKİSİ

Hale BAYRAM
191550103

DOKTORA TEZİ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı
Danışman: Prof. Dr. Mehmet CINCIK
2.Danışman: Doç. Dr. Mustafa Erinç SİTAR

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Ocak, 2023

BLEOMİSİN ETOPOSİD CİS-PLATİN TEDAVİSİ UYGULANAN SIÇAN MODELLEMESİNDE OLUŞAN SPERM DNA FRAGMANTASYONUNA GLUTATYONUN ETKİSİ

Hale BAYRAM
191550103
Orcid: 0000-0002-6104-8820

DOKTORA TEZİ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı
Danışman: Prof. Dr. Mehmet CINCIK
2. Danışman: Doç. Dr. Mustafa Erinç SİTAR

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Ocak, 2023



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" ile bildirilen 6689 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" ile bildirilen 6689 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca ve bu çalışmanın yürütülmesi sırasında elini hep omzumda hissettiğim desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet CINCIK ve Doç. Dr. Mustafa Erinç SİTAR'a, çalışmalarım sırasında sürekli yanımda olan hiçbir konuda yardımını ve tecrübelerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Yaprak Dönmez ÇAKIL'a, Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi öğretim üyesi Prof. Dr. Şükrü YILDIRIM ve patoloji laboratuvar ekibine, deneylerimi yürüttüğüm MÜDEHAM ve MÜKKAM'nde çalışan tüm ekibe, projenin yürütülmesinde emeği geçen Tıbbiyeliler Dilara KOLSAN, Ayşe SARAÇ ve Zeynep GELİRLİ'ye, yoğun çalışmalarımda, stres altındaki zamanlarımda en büyük destekçim olan eşim Dr. Mustafa BAYRAM'a, her zaman çalışmama engel olmayıp harika bir çocuk olan oğlum Ramazan Anıl BAYRAM'a, eğitim hayatımın her döneminde destekçim olup yardımıma koşan annem Gönül MEYDANALDI ve anneannem Ayşe ÖZPINAR'a, maddi manevi desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Seçkin YALÇINKAYA ve Duygu KÜTÜK'e, en zorlandığım kırılma noktalarımda pozitif enerjisiyle destek olan arkadaşım Özen İNAM'a teşekkürü borç bilirim.

Hale BAYRAM

Ocak, 2023

ÖZET

BLEOMİSİN ETOPOSİD CİS-PLATİN TEDAVİSİ UYGULANAN SIÇAN MODELLEMESİNDE OLUŞAN SPERM DNA FRAGMANTASYONUNA GLUTATYONUN ETKİSİ

Hale Bayram
Doktora Tezi
Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı
Histoloji Embriyoloji Doktora Programı
Danışman: Prof. Dr. Mehmet Cıncık
Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 2023

Testis kanseri üreme çağındaki genç erkeklerde (20-40 yaş) sık görülen malign tümörlerdendir. Tedavisinde kullanılan cis-platin bazlı kemoterapötik ajanlar ve spesifik Bleomisin, Etoposit ve cis-platin (BEP) kombinasyonu sağ kalımı arttırırken sağlıklı dokularda da hasar oluşmasına neden olmaktadır. Hasar oluşturduğu önemli dokulardan biri de testis dokusu ve sperm hücreleridir. Bu çalışmada uygulanan BEP tedavisinin sıçanlarda oluşturduğu sperm DNA bütünlüğü ve testis histomorfolojisi hasarları üzerine glutatyon (GSH) uygulamasının koruyucu etkisi araştırıldı.

Üreme çağındaki 12 haftalık erkek sıçanlar (n=24) rastgele her grupta 8 tane olacak şekilde kontrol, BEP ve BEP+GSH olarak 3 gruba ayrıldı. BEP grubuna 9 hafta boyunca her biri 21 günlük 3 kür olacak şekilde ön çalışmada belirlenen BEP dozlarına göre (0,083; 0,83; 0,17 mg/kg) tedavi intraperitonal olarak uygulandı. BEP+GSH grubuna BEP grubuna uygulanan kemoterapötik tedaviyle birlikte 9 hafta boyunca, her hafta düzenli olarak, haftanın 1.ve 4.gunlerinde Glutatyon 200 mg/kg uygulandı. Kontrol grubuna ise diğer gruplara ilaç uygulanan günlerde %0,9 NaCl intraperitonal olarak verildi.

Grupların ağırlık artışları karşılaştırıldığında BEP+GSH grubunun ağırlık artışı BEP grubunun ağırlık artışına göre anlamlılık göstermedi ($p=0,921$). Kontrol grubundaki artış BEP grubu ve BEP+GSH grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,027$, $p<0,012$). Benzer şekilde kontrol grubunun sol testis ağırlıkları ($p<0,017$; $p<0,003$), sol epididimis ağırlıkları ($p<0,029$; $p<0,037$), sağ epididimis ağırlıkları ($p<0,002$; $p<0,004$), testis

ağırlık indeksleri ($p<0,0017$; $p<0,001$) BEP grubu ve BEP+GSH grubuna göre yüksek bulundu. BEP+GSH uygulanan grup ile kontrol grubunda morfolojik anomali oranı ve sperm DNA fragmantasyonu BEP grubuna göre oldukça düşük bulundu ($p<0,001$; $p<0,001$). BEP+GSH grubu ile kontrol grubunun serum testosteron seviyesi ve sperm sayısının BEP grubuna göre yüksek olduğu görüldü. Testislerde seminifer tübül epitel kalınlıklarının ve Johnsen skorlarının kontrol grubu ve BEP+GSH grubunda BEP grubuna göre daha kalın olduğu görüldü ($p<0,000$).

Sonuç olarak GSH tedavisinin, BEP tedavisi alan sıçanlarda sperm sayısını, sperm morfolojik yapısını ve testis morfolojisini iyileştirmiş ve sperm DNA fragmantasyonunu azaltmış, bu nedenlerden dolayı kemoterapötiklerin sebep olduğu erkek infertilitesinde potansiyel iyileşme sağlamıştır.

Anahtar Sözcükler: Antineoplastik Birleşik Kemoterapi Protokolleri, Spermatozoa, DNA Fragmantasyonu, Antioksidanlar

ABSTRACT

THE EFFECT OF GLUTATHIONE ON SPERM DNA FRAGMENTATION IN RAT MODELS OF BLEOMYCIN ETOPOSIDE CIS-PLATIN TREATMENT

Hale Bayram
PhD Thesis
Histology Embriology Department
Histology Embriology Doctorate Programme
Thesis Advisor: Prof. Dr. Mehmet Cıncık
Maltepe University Graduate School, 2023

Testicular cancer is one of the most common malignant tumors in young men of reproductive age (20-40 years). The combination of cis-platin-based chemotherapeutic agents and specific Bleomycin, Etoposide and cis-platin (BEP) used in its treatment increases survival and causes damage to healthy tissues. One of the important tissues in which it is damaged is testicular tissue and sperm cells. In this study, we investigated the protective effect of glutathione (GSH) application on sperm DNA integrity and testicular histomorphology damage caused by BEP treatment in rats.

Twenty two-week-old male rats of reproductive age (n=24) were randomly divided into 3 groups as control, BEP and BEP+GSH, 8 rats in each group. The BEP group was administered intraperitoneally for 9 weeks, 3 cycles of 21 days each, according to the BEP doses determined in the preliminary study (0.083; 0.83; 0.17 mg/kg). Glutathione 200 mg/kg was administered to the BEP+GSH group on the 1st and 4^{th} days of the week for 9 weeks, together with the chemotherapeutic treatment applied to the BEP group. In the control group, 0.9% NaCl was given intraperitoneally on the days when the other groups were treated with drugs.

When the weight gains of the groups were compared, the weight gain of the BEP+GSH group was not significant compared to the weight gain of the BEP group ($p=0.921$). The increase in the control group was higher than the BEP group and BEP+GSH group ($p<0.027$, $p<0.012$). Similarly, left testis weights ($p<0.017$; $p<0.003$), left epididymis weights ($p<0.029$; $p<0.037$), right epididymis weights ($p<0.002$; $p<0.004$), testicular

weight indices ($p<0$) of the control group ,0017; $p<0.001$) were higher than BEP group and BEP+GSH group. Morphological anomaly rate and sperm DNA fragmentation were found to be considerably lower in the BEP+GSH group and the control group compared to the BEP group ($p<0.001$; $p<0.001$). Serum testosterone level and sperm count of BEP+GSH group and control group were higher than BEP group. It was observed that seminiferous tubule epithelial thicknesses and Johnsen scores in testicles were thicker in the control group and BEP+GSH group compared to the BEP group ($p<0.000$).

In conclusion, GSH treatment improved sperm count, sperm morphology, and testicular morphology in BEP-treated rats, and decreased sperm DNA fragmentation, thus potentially improving male infertility caused by chemotherapeutics.

Keywords: Antineoplastic Combined Chemotherapy Protocols, Spermatozoa, DNA Fragmentation, Antioxidants

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
TABLOLAR LİSTESİ xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiv
KISALTMALAR xvi
1. GİRİŞ 1
1.1 Problem 1
1.2 Amaç 2
1.3 Önem 2
1.4 Varsayımlar 3
1.5 Sınırlıklar 3
1.6 Tanımlar 4
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1 Erkek Üreme Sistemi 5
2.1.1 Testis embriyolojisi 5
2.1.1.1 Gonadların gelişimi 5
2.1.1.2 Testis gelişimi 6

2.1.1.3 Erkek genital kanalların gelişimi 7
2.1.1.4 Erkek dış genital organların gelişimi 7
2.1.2 Testis histolojisi 8
2.1.2.1 İntertisyel (Leydig) hücreler 9
2.1.2.2 Seminifer tübüller 10
2.1.2.3 Sertoli hücreleri 10
2.1.3 Genital boşaltım kanalları 11
2.1.3.1 Epididimis 11
2.1.3.2 Duktus (Vas) deferens 12
2.1.4 Yardımcı bezler 13
2.1.4.1 Seminal veziküller 13
2.1.4.2 Prostat bezi 13
2.1.4.3 Bulboüretral bezler (Cowper bezleri) 14
2.1.5 Penis 14
2.2 Spermatogenezis 14
2.3 Spermiyogenezis 16
2.4 Kapasitasyon 17
2.5 Olgun Spermin Yapısı 17
2.5.1 Sperm baş yapısı 18
2.5.2 Kuyruk yapısı ve hareketlilik 19
2.5.3 Sperm morfolojisi 19

2.6 Sperm Kromatin Yapısı ve DNA Fragmantasyonu 21
2.6.1 Serbest oksijen radikallerinin oluşumuna bağlı hasarlar 21
2.6.2 Apoptoz 22
2.6.2.1 Hücre içi (mitokondriyal) yol 23
2.6.2.2 Hücre dışı yol 23
2.7 Antineoplastik Tedaviler 23
2.7.1 Bleomisin 23
2.7.2 Etoposit 24
2.7.3 Cis-Platin 24
2.8 Antioksidan Tedaviler 24
2.8.1 Erkek infertilitesinde antioksidanlar 24
2.8.2 Glutatyon 25
3. YÖNTEM 26
3.1 BEP Protokolü ve Antioksidan tedavisi 26
3.1.1 Ön çalışmayla antineoplastik ilaç dozlarının belirlenmesi 26
3.1.2 Deney grupları ve ilaç uygulamaları 26
3.2 Dokuların Alınması 29
3.3 Sperm toplama ve değerlendirmesi 29
3.3.1 Makler kamerası ile sperm sayımı 30
3.3.2 Sperm morfolojisi değerlendirme 31
3.3.3 TUNEL boyama için sperm fiksasyonu ve örnek hazırlama 32
3.3.4 TUNEL yöntemi ile fragmantasyon tayini 33

3.4 Testis Histomorfolojisi 35
3.4.1 Doku takibi 36
3.4.2 Hemotoksilen-Eozin (H&E) boyama 37
3.4.3 Seminifer tübül epitel kalınlığı ölçümü 38
3.4.4 Johnsen skorlama 38
3.5 Testosteron seviyesi ölçümü 39
3.6 Araştırma Modeli 39
3.7 Evren ve Örneklem 39
3.8 Veriler ve Toplanması 39
3.9 Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması 39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 41
4.1 Bulgular 41
4.1.1 Vücut, testis ve epididimis ağırlıklarının değerlendirilmesi 41
4.1.2 Sperm parametreleri, sperm DNA fragmantasyonu ve serum testosteron seviyesinin değerlendirilmesi 47
4.1.3 Testis histopatolojisinin değerlendirilmesi 56
4.2 Tartışma 64
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 70
KAYNAKLAR 73
EKLER 87
EK 1: Etik Kurul Onay Formu 87
EK 2: Deney hayvanları kullanım sertifikası 88
ÖZGEÇMİŞ 89

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Örneklem grupları ve tedavi protokolleri 28
Tablo 2. Epididimisten sperm elde edilmesi 29
Tablo 3. TUNEL boyama için fiksasyon yöntemi 33
Tablo 4. TUNEL kiti hazırlama protokolü (TUNEL Assay Kit-FITC (ab66108)) 35
Tablo 5. Doku takip aşamaları 36
Tablo 6. Hemotoksilen-Eozin (H&E) boyama yöntemi 37
Tablo 7. Johnsen skorlama yöntemi 38
Tablo 8. Kontrol, BEP ve BEP+GSH gruplarında ağırlık değişimleri 41
Tablo 9. Ağırlık artışları gruplar arası karşılaştırma 42
Tablo 10. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) gruplar arası karşılaştırma 43
Tablo 11. Sol testis ağırlıkları gruplar arası karşılaştırma 43
Tablo 12. Sağ testis ağırlıkları gruplar arası karşılaştırma 44
Tablo 13. Sol epididimis ağırlıkları gruplar arası karşılaştırma 45
Tablo 14. Sağ epididimis ağırlıkları gruplar arası karşılaştırma 46
Tablo 15. Kontrol, BEP ve BEP+GSH gruplarında sperm parametreleri 47
Tablo 16. Sperm sayısı gruplar arası karşılaştırma 48
Tablo 17. Morfolojik anomali oranı gruplar arası karşılaştırma 50
Tablo 18. Baş, çekirdek ve kromozom anomalisi gruplar arası karşılaştırma 51
Tablo 19. Boyun-kuyruk anomalisi gruplar arası karşılaştırma 52
Tablo 20. Sperm DNA fragmantasyonu gruplar arası karşılaştırma 54
Tablo 21. Serum testosteron seviyesi gruplar arası karşılaştırma 55
Tablo 22. Kontrol, BEP ve BEP+GSH gruplarında testislerin histolojik değerlendirmesi 56
Tablo 23. Seminifer tübül epitel kalınlıkları gruplar arası karşılaştırma 56
Tablo 24. Johnsen skorlaması gruplar arası karşılaştırma 58
Tablo 25. Serum testosteron seviyesi, sperm parametreleri ve testis histopatolojisinin sperm DNA fragmantasyonu ile ilişkisi 60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Mezenterik kanal ve genital sırt-mezonefroz ilişkisi 6
Şekil 2. 3 haftalık embriyoda germ hücreleri ve göç yolları 6
Şekil 3. Dış genital farklanmamış evreleri 4. ve 6. Hafta..... 7
Şekil 4. Erkek dış genital organlar gelişimin 10. Haftası 8
Şekil 5. Testisin yapısı..... 9
Şekil 6. Seminifer tübül yapısı 10
Şekil 7. Spermatogenezis..... 16
Şekil 8. Spermiyogenezis 17
Şekil 9. İnsan spermin yapısı..... 18
Şekil 10. Sıçan spermi yapısı..... 18
Şekil 11. Sıçan spermi spermac boyama (40X)..... 18
Şekil 12. İnsan sperm morfolojik anomalileri 20
Şekil 13. Sıçan sperm anomalileri (A) Başsız sperm (B) Düzleşmiş başlı sperm (C) Toplu iğne başlı sperm (D) Kırık boyunlu sperm (E) Kırık kuyruklu sperm (F) Çoklu anomalili sperm..... 20
Şekil 14. Deneklere ilaçların hazırlanıp uygulanması 27
Şekil 15. Epididimislerin alınması..... 30
Şekil 16. Makler kamerası 30
Şekil 17. Makler kamerası mikroskop görünümü 31
Şekil 18. Spermac boyama yöntemi 32
Şekil 19. TUNEL yöntemi ile DNA boyama şeması..... 34
Şekil 20. BEP grubundaki 8 no'lu sıçanın sağ ve sol testis boyutu farkı 44
Şekil 21. BEP grubundaki 3 no'lu sıçanın sağ ve sol testisindeki boyut farkı 45
Şekil 22. Kontrol grubu Makler sperm sayımı (20X)..... 48
Şekil 23. BEP grubu Makler sperm sayımı (20X)..... 49
Şekil 24. BEP+GSH grubu Makler sperm sayımı (20X)..... 49
Şekil 25. BEP grubu kırık kuyruk morfolojisi (Turuncu oklar) (Spermac boyaması, 40X) 50
Şekil 26. BEP grubu yassılaşmış kafa morfolojisi (Spermac boyama, 40X) 51

Şekil 27. BEP grubu kırık boyun morfolojisi (Turuncu oklar) (Spermac boyama, 40X) 53
Şekil 28. Çoklu anomali (kırık boyun+kırık kuyruk) morfolojisi (Spermac boyama, 40X) 53
Şekil 29. Kontrol grubu sperm kon-fokal mikroskop görüntüsü; DNA PI boyama (A) TUNEL (-) (kırmızı oklar), FITC boyama (B), PI+FITC boyama (C) (20X) 54
Şekil 30. BEP grubu sperm kon-fokal mikroskop görüntüsü; DNA PI boyama (A) TUNEL (-) (kırmızı oklar), FITC boyama (B) TUNEL (+) (sarı oklar), PI+FITC boyama (C) (20X)..... 55
Şekil 31. BEP+GSH grubu sperm kon-fokal mikroskop görüntüsü; DNA PI boyama (A) TUNEL (-) (kırmızı oklar), FITC boyama (B), PI+FITC boyama (C) (20X) 55
Şekil 32. Kontrol grubu testis histogram (H&E Boyama, 10X)..... 57
Şekil 33. BEP grubu testis histogram (H&E boyama, 10X) 57
Şekil 34. BEP+GSH grubu testis histogram (H&E boyama, 10X) 58
Şekil 35. Kontrol grubu seminifer tübül histogram (H&E boyama, 40X) 59
Şekil 36. BEP grubu seminifer tübül histogram (H&E boyama, 40X) 59
Şekil 37. BEP+GSH grubu seminifer tübül histogram (H&E boyama, 40X) 60
Şekil 38. Sperm DNA fragmantasyonu sperm sayısı ilişkisi..... 61
Şekil 39. Sperm DNA fragmantasyonu morfolojik anomalili sperm oranı ilişkisi 61
Şekil 40. Sperm DNA fragmantasyonu serum testosteron seviyesi ilişkisi 62
Şekil 41. Sperm DNA Fragmantasyonu Seminifer Tübül Epitel Kalınlığı İlişkisi 63
Şekil 42. Sperm DNA fragmantasyonu johnsen skorlaması ilişkisi..... 63

.

KISALTMALAR

AMH : Anti-Müllerian Hormon

BEP : Bleomisin Etoposid Cis-platin

DNA : Deoksiribonükleik asit

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

ER : Endoplazmik Retikulum

FM : Floresan Mikroskopi

GSH : Glutatyon

GPx : Glutatyon peroksidaz

GST : Glutatyon-S-transferaz

GR : Glutatyon redüktaz

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

IV : İntravenöz

IP : İntraperitonal

IVF : İn vitro fertilizasyon

ICSI : İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

MÜDEHAM : Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi

MÜHADYEK: Maltepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

O_2 : Oksijen

Se : Selenyum

SF : Serum Fizyolojik

SOR : Serbest oksijen radikalleri

PBS : Fosfat Tamponlu Tuz

TdT : Terminal deoksinükleotidil transferaz

dUTP : Deoxyuridine Triphosphate

Zn : Çinko

1. GİRİŞ

1.1 Problem

Fertilizasyon ovum ve spermatozoa arasında gerçekleşen birtakım etkileşimler sonrası gerçekleşen karmaşık bir süreçtir. Bu süreç oogenezis ve spermatogenezis sonrası oluşan dişi ve erkek gamet hücrelerinin füzyonu ile gerçekleşir. İnsanlarda ve tüm hayvanlarda türünün devamı için bu süreçlerin devamlılığı önemlidir (Moore, 2016). Fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için en önemli parametre gametogenez sonucu sağlıklı ovum ile spermatogenezis sonucu oluşan sperm hücresinin birleşmesidir. Kadınlarda ve erkeklerde çeşitli sebeplerle üreme sağlığı olumsuz etkilenebilir. Düzenli cinsel ilişkiye rağmen 30 yaş altı kadınlarda 1 yıl boyunca, 30 yaş üstü kadınlarda 6 ay içerisinde gebe kalamama durumu infertilite olarak tanımlanır (Agarwal, Mulgund, Hamada ve Chyatte, 2015). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2010 yılı verilerine göre infertilite oranı dünya genelinde %12-15 olarak bildirilmiştir. İnfertilite oranının %35 i kadın kaynaklı sebepler, %30'u erkek kaynaklı sebepler, %20'si hem kadın hem erkek kaynaklı sebepler, %15'i ise açıklanamayan infertilite olarak tanımlanmıştır (Agarwal vd., 2015; World Health Organization, 2021). İnfertilite sebepleri olarak son on yılda moleküler belirteçler sıklıkla araştırılmaktadır. Umut vadeden testler arasında sperm DNA kalitesini ölçen testler gösterilmektedir. Üreme sağlığı, sperm DNA fragmantasyonu, döllenme, embriyo kalitesi, implantasyon, çocukluk döneminde geçirilen bazı hastalıklar gibi birçok nedenle yakından ilişkilidir. Erkek infertilitesinin birçok sebebi olmakla birlikte; iç ve dış sebepler kaynaklı sperm DNA fragmantasyonunun da infertilite sebebi olduğu bildirilmiştir (Lewis ve Agbaje, 2008). Yine sperm DNA fragmantasyonu, hem doğal hem de in vitro fertilizasyon (IVF) ile intrasitoplazmik sperm injeksiyonunda (ICSI) gebelik olasılığını azalmakta ve erken dönemde gebelik kayıplarına neden olmaktadır (Krausz, 2011).

Testis kanseri üreme çağındaki genç erkeklerde sıkça görülen bir kanser türüdür (Marcon, Hales ve Robaire, 2008). Etyolojisinde germ hücreleri, kriptorşidizm ya da genetik sebepler gösterilmektedir (Ferlin ve Foresta, 2014). Tedavisinde çeşitli kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Cis-platin bazlı kemoterapötiklerin kullanımında uzun süreli sağ kalım oranı %70 olarak gösterilmiştir (Ehrlich, Margel, Lubin ve Baniel, 2015;

Newlands, Rustin, Begent, Parker, ve Bagshawe, 1983; Roth, Greist, Kubilis, Williams, ve Einhorn, 1988). Spesifik olarak Bleomisin, Etoposid ve Cis-Platin (BEP) kombinasyonu olarak kullanılmasında 5 yıllık sağ kalım oranı %90 olarak bulunmuştur (Einhorn ve Foster, 2006; Gil vd., 2016; Kopp vd., 2006) Bu yüksek tedavi oranının yanında uygulanan BEP kombinasyonunun üreme fonksiyonları ve fertilite üzerine olumsuz etkileri bildirilmiştir. Yapılan hayvan çalışmalarında testis ağırlıklarında, sperm sayısında ve hareketliliğinde azalma, kuyruk anomalileri bununla birlikte sperm başındaki proteinler üzerinde kalıcı dejenerasyon ve DNA ipliğinde kırılmalar gösterilmiştir (Ateşşahin vd., 2006; Bieber, 2006; Maselli, Hales, Chan ve Robaire, 2012). Cis-platin kombinasyonlarının sperm DNA fragmantasyonunu arttırdığı ve bu nedenlerle erkek infertilitesine sebep olduğu düşünülmektedir (Singh, Goyal ve Ranawat, 2017). İnfertilite değerlendirmelerinde spermin genomik bütünlüğünün değerlendirilmesi, son yıllarda klasik semen analiz yöntemleri arasından daha da öne çıkan bir yaklaşım haline gelmiştir. Bunun sebebi, spermdeki DNA fragmantasyon oranının tedavi protokolünü doğrudan etkilediğinin ortaya konmuş olmasıdır (Cho, Agarwal, Majzoub ve Esteves, 2017).

1.2 Amaç

Amacımız üreme çağındaki genç erkeklerde görülen testis kanserinin tedavisinde kullanılan BEP protokolünün neden olduğu düşünülen erkek infertilitesinde antioksidan özelliği bilinen glutatyonun koruyucu etkisini araştırmaktır. Bu amaçla cevaplamaya çalıştığımız sorular aşağıdaki gibidir:

- BEP protokolü uygulanan erkeklerde glutatyon tedavisi sperm DNA fragmantasyonunu önlemede etkin bir madde olabilir mi?
- BEP protokolü uygulanan erkeklerde glutatyon tedavisi testis histopatolojisinde etkili olabilir mi?
- BEP protokolü uygulanan erkeklerde glutatyon tedavisi kanda androjen hormon seviyelerini etkiler mi?

1.3 Önem

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar kanserli hücreleri tedavi ederken diğer dokulara ve organlara da zarar vermektedir. Zarar oluşturduğu en önemli

organlardan biri de gonadlardır. Üreme fonksiyonlarını engellemekte, kadın ve erkekte gametlerde anomaliler oluşturmakta, DNA yapısının bozulmasına sebep olarak infertiliteye sebep olmaktadır. Tüm bu olumsuz etkileri ortadan kaldırmak ya da azaltmak amacıyla uygulanan antioksidan tedavilerin etkinliğinin araştırılması ve uygulanması kemoterapötik tedavi sonrası oluşabilecek infertiliteyi engelleyebilir ya da görülme oranını azaltabilir. Daha önce farklı antioksidan maddelerle yapılan hayvan deneylerinde kullanılan antioksidanların testis hasarını azalttığı, DNA fragmantasyon oranını azalttığı ve birbirlerine göre üstünlükleri gösterilmiştir. Antioksidan özelliği iyi bilinen glutatyonun da kemoterapötik tedavi sırasında koruyucu etkinliğinin belirlenmesi literatür için önemli katkı sağlayacaktır.

1.4 Varsayımlar

Hayvan deneylerinde çalışılan vitamin E, resveratrol, arı sütü, çinko, kurkumin gibi birçok antioksidan madde testis toksisitesini ve sperm DNA fragmantasyonunu %100 engellememiş ancak önemli oranda azalttığı görülmüştür (Amirshahi, Najafi ve Nejati, 2014; Khadivi, Razavi ve Hashemi, 2020; Sahoo, Roy ve Chainy, 2008; Singh vd., 2017). Antioksidanların dondurma işlemi yapılırken sperm medyumlarına konmasının oksidatif stresi düşürerek sperm DNA fragmantasyonunu azalttığı bununda sperm saklama başarısını arttırabileceği gösterilmiştir (Özekici, Cıncık, Selam, Çakıl ve Çelik, 2020). BEP tedavisi uygulanan sıçanlarda BEP'nin uygulanmasını takiben çinko uygulanmasının sitotoksik etkileri azalttığı gösterilmiştir (Khadivi vd., 2020; Razavi, Khadivi, Hashemi ve Bakhtiari, 2019). Yapılan çalışmalardaki antioksidan uygulamaları ve sonuçlarından yola çıkarak glutatyonunda testisin histolojik yapısı, sperm morfolojisi ve DNA'sı üzerinde koruyucu olduğu düşünülmektedir.

1.5 Sınırlıklar

Çalışmamızda tüm grupların tedavi protokolü uygulanmadan önce sperm DNA fragmantasyon düzeylerine bakılması, tedavi protokolleri uygulandıktan sonra tekrardan sperm DNA fragmantasyon düzeylerine bakılması düşünüldü. Ancak bu işlemin testisten iğne aspirasyonuyla yapılacak olmasının hayvan üzerinde ekstra stres oluşturabileceği ve stresinde serbest oksijen radikallerini arttırabileceği göz önüne alınarak bunun yerine pozitif ve negatif kontrol grubu oluşturulması planlandı. Bunun dışında hem hayvanlara

uygulanacak girişimsel işlemlerin artmasının etik açıdan doğru bulunmaması hem de iki kez tekrarlanan işlemin proje maliyetini arttırması nedeniyle öncesinde sperm DNA fragmantasyon seviyesine bakılmamasına karar verildi.

1.6 Tanımlar

Antioksidan: Canlı hücrelerdeki serbest radikaller olarak adlandırılan ve hücreye zarar veren toksik maddelerin uzaklaştırılmasına yardımcı hücrelerin kendisi tarafından da sentezlenebilen moleküllerdir.

Sperm DNA fragmantasyonu: Sperm olgunlaşması sırasında DNA yapısında meydana gelen kırık ve bozulmalardır.

Kemoterapötik: İnsan vücudunu işgal eden enfeksiyon ya da malign tümörlere karşı uygulanan ilaç tedavisi.

Spermatozoa: 23 kromozom içeren erkek bireye ait üreme hücresidir.

2. GENEL BİLGİLER

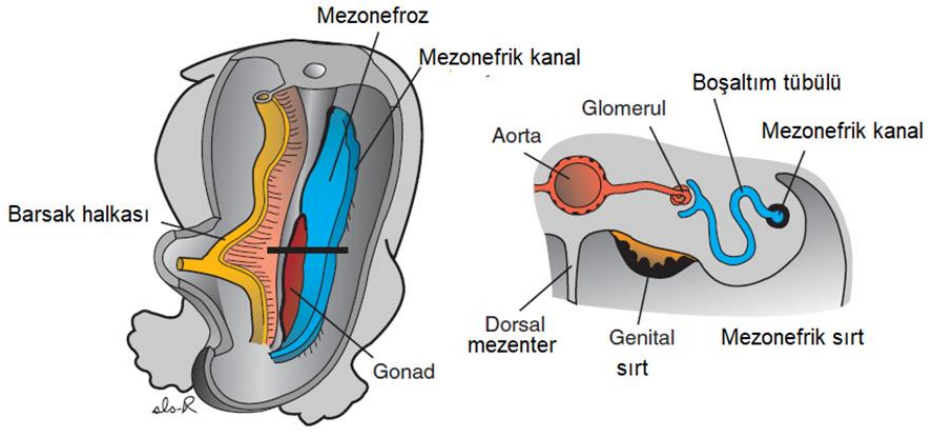
2.1 Erkek Üreme Sistemi

2.1.1 Testis embriyolojisi

Cinsiyet farklanması, bazısı otozomal birçok genin önemli rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Kısa kolu üzerinde SRY geni taşıyan Y kromozomu sayesinde gerçekleşir. SRY geni cinsiyet organlarının gelişiminin belirleyicisidir. Transkripsiyon yapılan protein testis belirleyici faktördür (TBF). Bu faktör varsa erkek fenotip yoksa kız fenotipte fetüs gelişimi gözlenir (Ross ve Pawlina, 2017; Sadler, 2020).

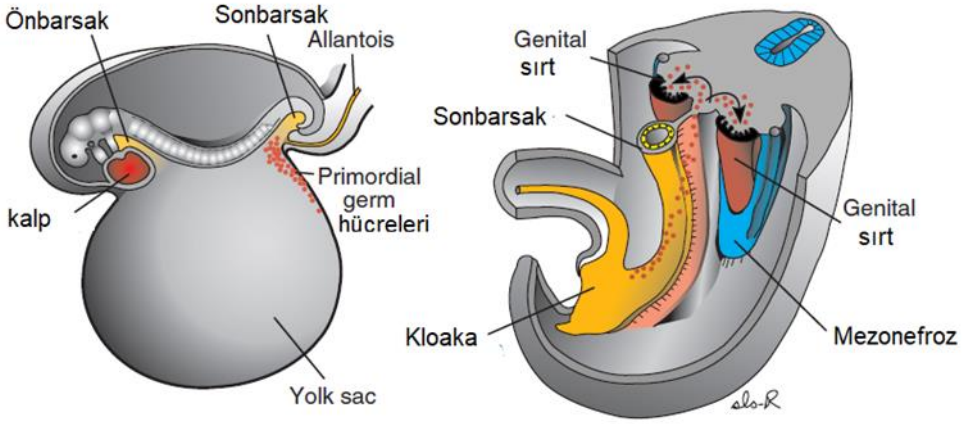
2.1.1.1 Gonadların gelişimi

Embriyonun cinsiyeti genetik olarak fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına karşın, morfolojik olarak gelişimin 7. haftasına kadar dişi veya erkek özellikler belirgin değildir. Gonadlar epitel proliferasyonu ve mezenşim dokunun yoğunlaşması sonucu oluşmuş uzunlamasına bir çift genital sırt şeklinde çıkar (Şekil 1). 6. gelişim haftasında germ hücreleri henüz genital sırtların içinde değildir. Epiblast kökenli germ hücreleri 3. haftada primitif çizgi boyunca göç edip yolk kesesinin allantoise yakın bölgesindeki endoderm hücreleri arasına yerleşir, 4. Haftada ameboid hareketler göstererek son barsak mezenterinin dorsal kısmı boyunca ilerleyerek 5. haftanın başlarında primitif gonadlara gelir. 6. hafta da genital sırtlara yerleşir (Şekil 2). Bu hücrelerin yerleşmesiyle gonadların over ya da testise farklanması indüklenir (Cochard, 2013; Sadler, 2020; Tapul, 2018).



Şekil 1. Mezenterik kanal ve genital sırt-mezonefroz ilişkisi (Sadler, 2020)

.



Şekil 2. 3 haftalık embriyoda germ hücreleri ve göç yolları (Sadler, 2020)

2.1.1.2 Testis gelişimi

Embriyo genetik olarak Y kromozomu taşıyorsa yani erkekse SRY geni etkisiyle primitif cinsiyet kordonları testis ve medullar kordonları oluşturur. Bu kordonlar hilusa doğru daha sonra rete testis tübüllerini oluşturmak üzere sıralı hücreler halinde dağılırlar. İleri gelişim evrelerinde yoğun fibröz bir bağ doku olan tunica albugenia testis dokusunu yüzeyel epitelinden ayırır. 4. ayda uçları açık şekilde at nalı şeklini alan testis kordonları rete testis olarak devam eder. Testis kordonları primitif germ hücrelerinden ve bezin yüzeyel epitelinden gelişen sertoli hücrelerinden oluşur (Sadler, 2020; Tapul, 2018).

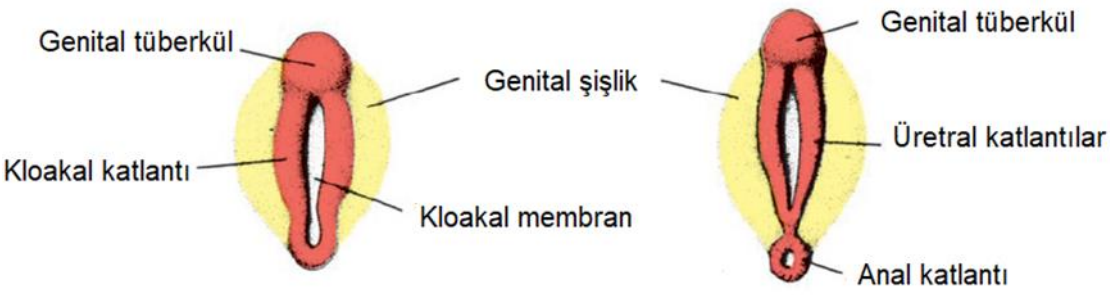
Testis puberte dönemine kadar solid bir organ olarak beklerken puberteyla birlikte lümenler açılır ve seminifer tübüllere dönüşür. Seminifer tübüller açılır açılmaz rete testis tübülleriyle birleşir ve eferent duktuslara girerler. Bu duktuslar rete testisle mezonefrik kanalları birbirine bağlayıp daha sonra duktus deferens adını alırlar (Cochard, 2013; Sadler, 2020).

2.1.1.3 Erkek genital kanalların gelişimi

Erkek genital kanalların mezonefrik böbrek sisteminin bazı bölümlerinden testosteron salgılanmasıyla gelişimi başlar. Boşaltım kanallarının bazıları rete testis kanallarıyla bağlanarak duktuli eferentesleri oluşturur. Mezonefrik kanallar, apendiks epididim olarak bilinen parçayla birleşip ana genital kanalları ayrıca eferent duktusların hemen altından itibaren kıvrılarak epididimisi oluşturur. Paramezonefrik kanalların kraniyal uçları kısmı dışında kalan büyük bölümü, sertoli hücreleri tarafından sentezlenen anti-Müllerian hormonun (AMH) etkisiyle dejenere olur (Sadler, 2020; Tapul, 2018).

2.1.1.4 Erkek dış genital organların gelişimi

3. gelişim haftasında primitif çizgiden köken alan mezenşim hücreleri kloakal katlantıyı oluşturur. Bu katlantı kloakal membran kranialinde genital tüberkülü, kaudalinde önde üretral katlantı, arkada ise anal katlantı yer alır (Şekil 3). Üretral katlantıların yanlarında bir çift yükselti oluşur, bu şişlik erkeklerde skrotum dişilerde labia majörleri oluşturacaktır (Cochard, 2013; Tapul, 2018).

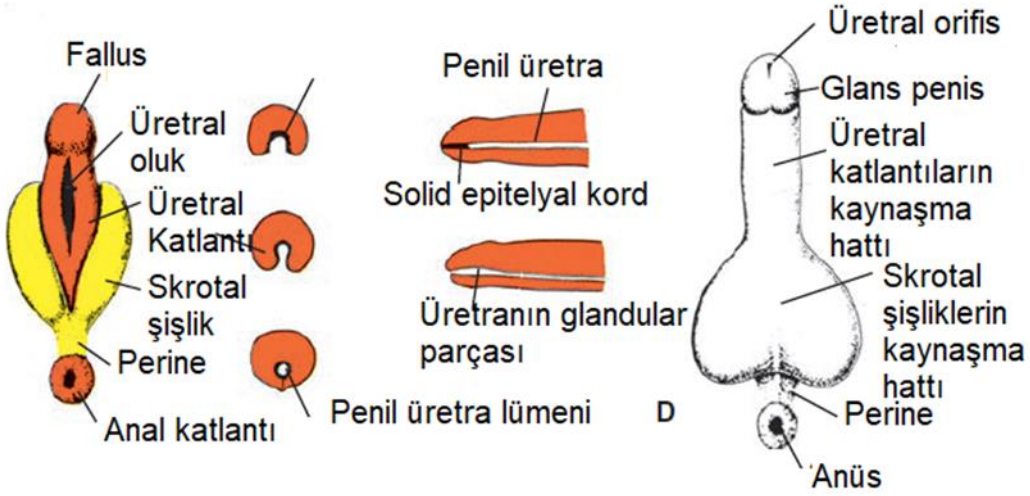


Şekil 3. Dış genital farklanmamış evreleri 4. ve 6. Hafta (Sadler, 2020)

Erkek dış genital organlar fetal testislerden salgılanan androjenlerin etkisiyle fallus adını alan genital tüberkül hızla uzar. Uzamayla beraber üretral katlantılar öne çekilerek üretral

oluğun duvarlarını oluşturur. Bu oluk fallusun kaudal kısmına gelir ancak glans kısmına ulaşmaz. Oluğun içini döşeyen endodermden köken alan epitel üretral plağı oluşturur (Şekil 4). 3. ay sonunda üretral kıvrımlar üretral plak üzerine kapanır ve penil üretrayı oluşturur (Cochard, 2013; Sadler, 2020).

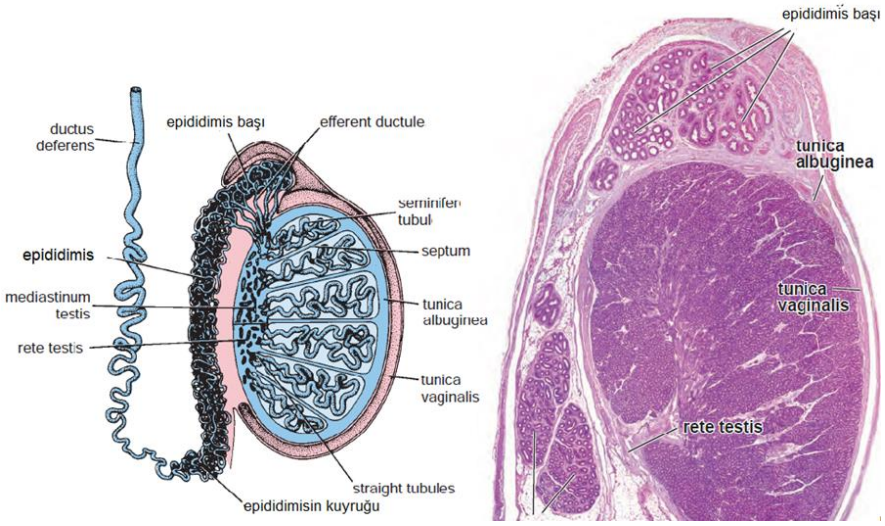
Skrotal şişlik olarak bilinen genital şişlikler, önce inguinal bölgede yerleşim gösterirken gelişimin ileri evrelerinde aşağıya inerek her iki tarafta hemiskrotum oluşturur. Hemiskrotumlar skrotal septumla birbirinden ayrılmıştır (Sadler, 2020; Tapul, 2018).



Şekil 4. Erkek dış genital organlar gelişimin 10. Haftası (Sadler, 2020)

2.1.2 Testis histolojisi

Yetişkin erkeklerde testisler skrotum içerisinde yerleşim gösteren 10-15 g ağırlığında Tunika albugenia adında bağ doku kapsülüyle çevrili bir çift organdır (Şekil 5). Tunika albugenia arka tarafta kalınlaşarak mediastinum testis yapısını oluştururken bez içine girerek lobüler yapıda olmasına neden olur. Yaklaşık 250 lobülün her birinde gevşek bağ dokuyla çevrili, kıvrımlı 1-4 seminifer tübül ve Leydig hücresi bulunur (Kierszenbaum ve Tres, 2016; Mescher, 2019).



Şekil 5. Testisin yapısı (Ross ve Pawlina, 2017)

Testisler embriyonel gelişimini karın boşluğunun arka duvarında gerçekleştirir. Fetüsün gelişmesiyle birlikte hareket ederek skrotuma gelirler ve burada spermatik kordonların ucunda asılı şekilde yerleşim gösterirler. Karın boşluğundan göç ettikleri sırada testisler tunika vaginalis denilen peritondan gelişmiş bir seröz kese taşır. Tunika vaginalis dış tarafta skrotumu döşeyen pariyetal tabaka ve iç tarafta tunika albugeniayı testisin ön-yan kısmından saran visseral tabakadan oluşur (Mescher, 2019).

Sperm oluşumu için gerçekleşen birtakım moleküler reaksiyonlar 37˚C de gerçekleşemez, bu reaksiyonlar için ideal sıcaklık 34˚C'dir. Testislerin 34˚C de bulunması için skrotumda çeşitli mekanizmalar bulunur. Bunlardan biri testiküler arterlerin her birinin serin kan içerin pampiniform venöz pleksus ile sarılı olmasıdır. Zıt yönlü ısı akış sistemi, venöz pleksus arteriyal kanın ısısını düşürerek testis sıcaklığını kontrol altında tutar (Mescher, 2019).

2.1.2.1 İntertisyel (Leydig) hücreler

Leydig hücreleri poligonal, büyük, eozinofilik ve lipit damlacıkları içeren tipik hücrelerdir. Bu hücrelerde Reinke kristalleri ve lipofuksin pigmenti sıklıkla görülür. Steroid salgısı yapan diğer hücreler gibi bol miktarda granülsüz endoplazmik retikulum içerir. Leydig hücreleri fetal hayatın erken dönemlerinde farklılaşıp testosteron salgılar. Testosteron salgılanması embriyonik gelişim sırasında gonadların farklılaşması,

pubertede cinsel olgunlaşma ve yetişkinlikte üreme fonksiyonlarının gelişimi için gereklidir (Kierszenbaum ve Tres, 2016; Ross ve Pawlina, 2017)

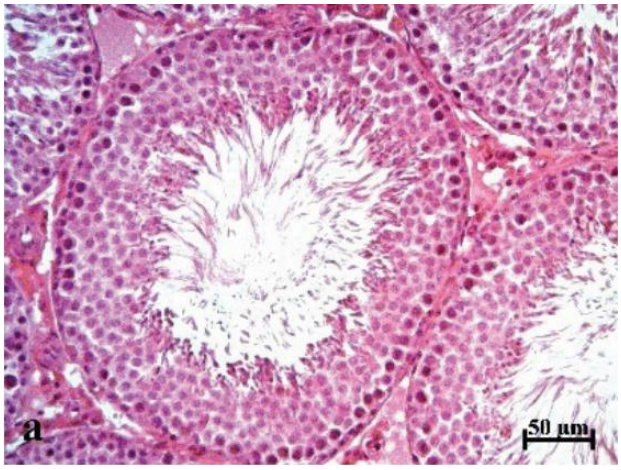
2.1.2.2 Seminifer tübüller

Ortalama genç, yetişkin bir erkekte seminifer tübüllerde günde $2x10^8$ sperm üretilir. Testislerin her birinde yaklaşık 250-1000 arası seminifer tübül bulunur (Şekil 6). Seminifer tübüller yaklaşık 150-250 µm çağında, 30-70 cm uzunluğundadır. Her bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu 250 metre kadardır. Seminifer tübüller oldukça kıvrımlı yapıdadır kısa, dar düz tübüller rete testislere bağlanır. Tübül, özelleşmiş çok katlı epitel olan germinal ve spermatogenik epitel ile sarılıdır (Kierszenbaum ve Tres, 2016; Mescher, 2019).

Germinal epitel;

• Bölünmeyen büyük sertoli hücreleri

• Bölünebilen spermatogenik seri hücreleri olmak üzere iki tip hücreden oluşur (Mescher, 2019).



Şekil 6. Seminifer tübül yapısı (Akpolat, Kamat, Gülle ve Bakkal, 2018)

2.1.2.3 Sertoli hücreleri

İlk olarak Enrico Sertoli tarafından fizyolojik önemi gösterilmiş olan Sertoli hücreleri, prizmatik veya piramidal epitel hücreleridir. Spermatogenik seri hücrelerinin tamamı sertoli hücrelerinin yüzeyiyle temas halindedir ve metabolik ve fizyolojik olarak destek

görevi görür. Her bir Sertoli hücresi yaklaşık 30-50 germ hücresini destekler. Mikroskobik yapısı incelendiğinde çok miktarda granülsüz endoplazmik retikulum (ER) içerirken, daha az miktarda granüllü ER, iyi gelişmiş bir Golgi cisimciği, sayısı oldukça fazla mitokondri ve lizozom içerir (Ross ve Pawlina, 2017).

Sertoli hücrelerinin önemli bir diğer görevi bazal ve lateral hücre zarlarında sıkı bağlantılarla seminifer epitelde kan-testis bariyerini oluşturmasıdır. Bu fiziksel bariyer en sıkı kan-doku bariyeridir ve bu sayede bağışıklık sistemi geliştikten sonra oluşan özgün spermatogenik hücreleri otoimmün saldırılara karşı korur (Mescher, 2019). Kan testis bariyerini oluşturmasıyla ilgili üç işlevi bulunur:

- Gelişmekte olan spermatositler, spermatidler ve spermler kan testis bariyeri nedeniyle besinlerden ve plazma proteinlerinden izole oldukları için bunların alımı ve atıklarının uzaklaştırılması için Sertoli hücrelerine bağımlı durumdadır. Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri bağışıklık sisteminden korurken farklılaşma sürecinde gerek duyduğu plazma proteinlerini sağlar.
- Seminifer tübülden devamlı üretilen spermin dışarı atılması için sıvı salgılar. Endokrin fonksiyonu olarak ön hipofizden Folikül Stimülan Hormon (FSH) salınmasını negatif geri bildirimle engelleyen 39-kDa inhibin glikoproteinini salgılar. Fetüste de Sertoli hücreleri AMH glikoproteinini üretir. Bu hormon paramezonefrik kanalların dejenere olmasını sağlar. AMH olmadığında bu kanallar dişi üreme sisteminin bir parçası olur.
- Spermiyogenez sırasında fazla sitoplazma ve oluşan atık cisimler Sertoli hücrelerinin lizozomları tarafından sindirilir. Bu da Sertoli hücresinin fagositoz fonksiyonu sayesinde olur (Mescher, 2019).

2.1.3 Genital boşaltım kanalları

Genital boşaltım kanalları, embriyonik gelişimde mezonefrik kanaldan gelişmekte, içten dışa doğru epididimis, duktus (vas) deferens ve üretradan oluşur.

2.1.3.1 Epididimis

Testisin süperior ve posterior yüzleri boyunca uzanan bir yapıdır. Uzunluğu yaklaşık 7,5 cm duktuli eferentes, duktus epididimis bunlarla ilişkili düz kaslar ve bağ doku kılıfından

oluşur. Duktus epididimis çok kıvrımlı 4-6 m uzunluğunda tüp yapıdadır. Epididimis baş, gövde ve kuyruk olarak üç bölümde incelenir. Duktuli eferentes baş kısmı, duktus epididimis gövde ve kuyruk kısmı olarak tanımlanmıştır. Yeni üretilen ve testisten duktus epididimise gelen hücreler bu bölgede motilite ve fertilizasyon yeteneği kazanır. Sperm başı epididimal sıvı glikonjugatlarla modifiye edilip dekapasitasyon olarak bilinen fertilizasyon yeteneğini geçici olarak inhibe eden bir sürece uğrar. Dişi üreme sisteminde fertilizasyondan hemen önce kapasitasyon işlemi sırasında yeniden fertilizasyon özelliği kazanır. Haploid DNA içeren sperm kapasitasyondan sonra zona pellusida üzerindeki sperm reseptörlerine bağlanır ve ardından akrozom reaksiyonu tetiklenir (Mescher, 2019; Ross ve Pawlina, 2017).

Epididimis yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşenmiştir. Bu epitel uzun stereosilyalı esas hücreler ve küçük yuvarlak şekilli kök hücrelerden oluşur. Esas hücrelerin bir görevi glikoprotein ve glikolipit salgılamakken aynı zamanda Sertoli hücrelerinin uzaklaştıramadığı sitoplazmik atıkların uzaklaştırılması ve suyun emilmesinde görev alır. Epitel birkaç tabaka düz kas ile sarılmıştır. İçte ve dışta uzunlamasına (longitudinal) olarak, epididimisin kuyruk kısmında halkasal bir tabaka şeklinde bulunur. Düz kaslar sayesinde peristaltik kasılmalar oluşturarak spermin kanal boyunca hareket etmesini sağlar (Mescher, 2019; Ross ve Pawlina, 2017).

2.1.3.2 Duktus (Vas) deferens

Kalın duvarlı, kas içeriği fazla, lümeni dar yapıda genital kanalın en uzun parçasıdır. Epididimisin kuyruk kısmından devam eder. Testisin posterior bölgesinde damarlar ve sinirlere komşu olarak seyreder. Sperm kordonunun bir parçası olarak inguinal kanaldan geçip abdomene girer. Spermatik kordon testise giden ve testisten gelen bütün yapıları içerir. Duktus deferense ek olarak testiküler arterleri, küçük arterleri, pampiniform pleksusu, lenf damarlarını, sempatik sinir lifleri ve femoral sinirin genital dalını içerir. Duktus deferens spermatik kordondan ayrıldıktan sonra mesaneye yaklaştığında genişler ve bu bölgesi duktus deferens ampullasını oluşturur. Duktus deferenste epididimise çok benzer ve yalancı çok katlı prizmatik epitelle örtülüdür. Mikroskobik görüntülendiğinde düz kasların fiksasyon sırasında kasılması nedeniyle epididimis gibi düzgün bir lümeni görünmez (Ross ve Pawlina, 2017).

Prostat bezinin içinde ampullanın uçları iki seminal veziküllе de birleşerek ejekulatuvar kanalı oluşturur. Bu kanal prostatik üretraya açılır (Mescher, 2019).

2.1.4 Yardımcı bezler

2.1.4.1 Seminal veziküller

Mesanenin arka duvarında her biri 15 cm uzunluğunda, çift olarak yer alan seminal veziküller früktoz bakımından oldukça zengin bir sıvı salgılar. Duktus deferensin ampulla bölgesine paralel konumlanan uzun, bol kıvrımlı ve katlantılı tübüler yapıda bezlerdir. Her bir seminal vezikül duktus deferensin ampullasıyla birleşerek ejekülatuvar kanalı oluşturur. Seminal vezikül duvarı mukoza, ince düz kas tabakası ve fibröz bir kılıftan oluşur. Kas tabakası içte dairesel, dışta boyuna yerleşim gösterir ve bezin salgısını boşaltmasını sağlar. Mukozası yüzey artırmak için oldukça fazla primer, sekonder ve tersiyer katlantılar yapar. Yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşenmiştir. Kısa hücreler, silyumsuz prizmatik hücrelerin köken aldığı kök hücrelerdir (Mescher, 2019; Ross ve Pawlina, 2017).

Seminal vezikülün salgısı ejekülatın yaklaşık %70'ini oluşturur. İçeriğinde früktoz başta olmak üzere, inositol, gibi sperm için enerji verici maddeler, kadın üreme sisteminde spermin etkileşmesini sağlayan prostoglandin ve semenin koagülasyonunu sağlayan fibrinojen bulunur (Kierszenbaum ve Tres, 2016; Mescher, 2019).

2.1.4.2 Prostat bezi

Mesanenin altında en büyük üremeye yardımcı bezdir. 2 cm x 3 cm x 4 cm boyutlarında yaklaşık 20 g ağırlığında tıkız bir organdır. Morfolojik ve fonksiyonel olarak birkaç zona ayrılır. Seminal sıvının yapısına katılan şeffaf, hafif alkali (p= 7,29) sıvı salgılar. Üretranın prostatik parçasının etrafını çevreler ve tübüloalveolar bez yapısındadır. Bu bezler konsantrik tabaka halinde düzenlenir; içte mukozal tabaka adı verilen bezin %5'ini oluşturan geçiş bölgesi, ortada submukozal tabaka olarak anılan %25'ini oluşturan merkezi bölge, dışta ise organın %70'ini oluşturan esas prostatik bezlerin bulunduğu periferik bölge yer alır. Prostatın tübüloasiner bezleri yalancı çok katlı prizmatik ya da tek katlı epitel içerir (Mescher, 2019).

2.1.4.3 Bulboüretral bezler (Cowper bezleri)

Cowper bezleri olarakta bilinen bulboüretral bezler 3-5 mm çapında, yuvarlak, bir çift organdır. Salgısını penil üretranın proksimaline boşaltır. Bezler testosteron bağımlı mukus salgılayan tek katlı prizmatik epitel ile örtülü ve düz kas hücreleriyle çevrelenmiş lobüler tübüloasiner yapıdadır. Ereksiyon boyunca bulboüretral bezler ve penil üretrada bulunan üretral bezler mukusa benzer salgı yaparak üretranın kayganlaşmasını sağlar ve spermin geçişini kolaylaştırır (Mescher, 2019).

2.1.5 Penis

Penis histolojik olarak transvers kesiti incelendiğinde iki korpus kavernosum ve bir korpus spongiosum olmak üzere üç erektil dokudan oluşmaktadır. Bu üç parça tunika albugenia adı verilen fibroelastik doku ile birbirine bağlanmış ve etrafında kapsül oluşturmuştur. Helisin arterler olarak bilinen arterler vasküler boşlukların kanla dolmasını ve boyutunun büyüyerek sertleşmesini sağlar. Korpus spongiosum ventralde penil üretrayı çevreler. Distalde korpus spongiosum genişleyerek glans penis denilen bölgeyi oluşturur. Penil üretranın büyük kısmı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile örtülü iken glans penis bölgesinde çok katlı yassı epitele dönüşmektedir. Mukus salgılayan üretral bezler penil üretra boyunca yerleşmiştir. Penis sempatik, parasempatik ve somatik sinirler tarafında uyarılır. Dokusunda bol miktarda sinir sonlanmaları bulunur (Mescher, 2019; Ross ve Pawlina, 2017).

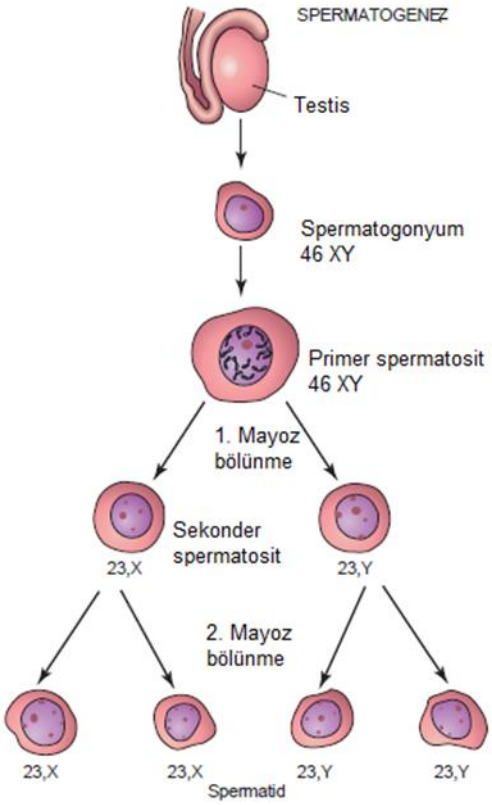
2.2 Spermatogenezis

Spermatogenez, mitoz ve mayoz bölünmeler sonucu spermatagonyum adı verilen kök hücrelerden sperm oluşması sürecidir. Testiste seminifer tübüllerde gerçekleşen bu süreçte spermler değişikliklere uğrar. Ancak tam döllenme yeteneklerini dişi üreme sistemine girdiklerinde elde ederler (Eşrefoğlu, 2017; Moore, 2016).

Testis hacminin büyük kısmını seminifer tübüller oluştururken bu tübülleri döşeyen seminifer epitel, spermatogenik hücreler ve sertoli hücrelerini içeren çok katlı epiteldir. Spermatogenik hücreler üst üste sıralanmış gelişimin farklı aşamalarında hücrelerdir. Spermatogonyumlar bazal kısımda yer alırken lümene yakın olanlar daha olgun spermatidlerdir, lümende ise spermiyumlar bulunur (Eşrefoğlu, 2017).

Spermatogenik hücre serisinin ilk hücreleri spermatogonyumlar puberte öncesinde erkek çocukların testisinde çok az sayıda, destek hücreleriyle sarılı halde bulunur. Pubertede destek hücreleri Sertoli hücrelerine dönüşür. Kök hücre görevindeki primer germ hücreleri spermatogonyal kök hücrelere farklanıp ardından mayoz bölünmelerde spermatidleri oluştururlar (Eşrefoğlu, 2017; Sadler, 2020).

Spermatogonyal kök hücrelerden seri mitoz bölünmeyle Tip A spermatogonyumlar, bunların kısıtlı sayıda geçirdiği mitoz bölünmenin sonunda da Tip B spermatogonyumlar ortaya çıkar. Tip A spermatogonyum oluşumu spermatogenezin başladığını gösterir. Spermatogonyumlar mitoz bölünme ile çoğalıp farklılaşır ve primer spermatositlere dönüşür (Şekil 7). Primer spermatositler mayoz bölünmenin başladığı hücrelerdir. 1. Mayoz bölünme ile primer spermatositler sekonder spermatositlere dönüşür diploid kromozom sayısı haploide indirgenir ancak kromozomlarında iki kromatid bulunduğundan DNA miktarı hala somatik hücredeki miktardadır. 2. Mayoz bölünme sonrasında haploit yapıda somatik hücrenin yarısı kadar DNA içeren spermatidler oluşur (Eşrefoğlu, 2017; Moore, 2016).



Şekil 7. Spermatogenezis (Moore, 2016)

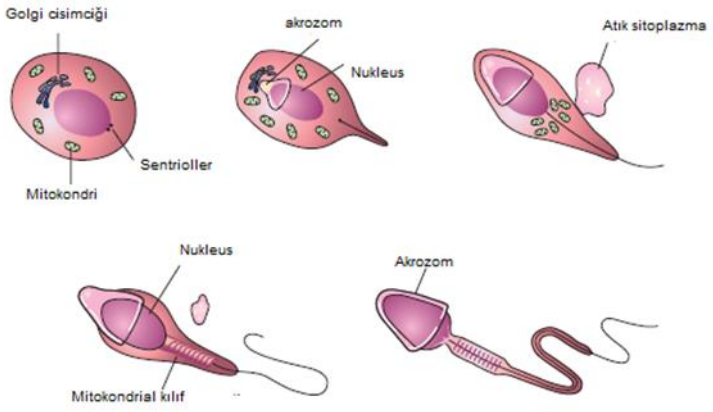
2.3 Spermiyogenezis

Mayoz bölünmelerin tamamlanması sonucu oluşan spermatidlerin spermatozoaya dönüşmesi sürecine spermiyogenez denir. Bu dönüşümler spermatogenezin başlamasından 64 gün sonra başlar, akrozom oluşması, çekirdeğin yoğunlaşması, boyun, orta parça ve kuyruk gelişmesi ile sitoplazmanın büyük kısmını atılmasıyla tamamlanır (Şekil 8). Atık cisimler Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatogonyumdan spermatozoon gelişimi yaklaşık 74 gün sürmektedir (Eşrefoğlu, 2017; Sadler, 2020).

Spermiyogenez dört dönemde incelenir:

1. **Golgi dönemi:** Oldukça fazla sayıda Golgi cisimciği bulunan PAS+ granüller ile karakterizedir. Bu proakrozomal granüller zengin glikoprotein içerir ve nükleus zarına yakın bölgedeki akrozomal vezikül zarıyla birleşir.
2. **Şapka dönemi:** Akrozomal vezikül nükleusun ön kısmını şapka gibi kaplar. Nükleusun buraya bakan membranında porlar kaybolur ve membran kalınlaşır.

3. **Akrozom dönemi:** Spermiyumların baş kısmı Sertoli hücrelerine gömülür. Bu dönemde belirgin bir değişiklik yaşanır. Kuyruk uzar ve seminifer tübül lümeninde görünmeye başlar. Yoğunlaşmış olan nükleus yassılaşır, akrozom apikal bölgeye iyice yaklaşır. Boyun ve orta parça kısmı sentriyolden kaynaklı mikrotübüllerle oluşmaya başlar.
4. **Olgunlaşma dönemi:** Sitoplazma miktarının oldukça azaldığı son dönemdir. Fazla sitoplazma atıldıktan sonra Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilip ortadan kaldırılır.



Şekil 8. Spermiyogenezis (Moore, 2016)

2.4 Kapasitasyon

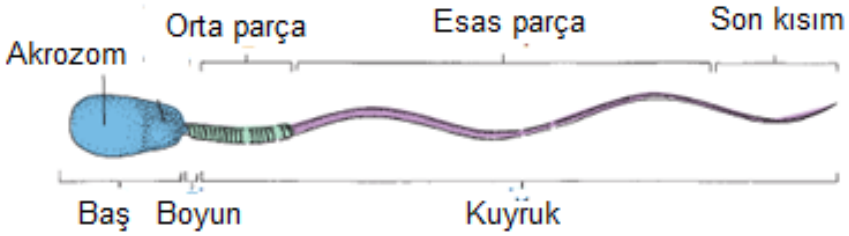
Kapasitasyon süreci dişi üreme sisteminde gerçekleşen spermiyumun morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleridir. Dişi üreme sisteminde 7 saat süren kapasitasyon sonrası spermiyum oositi dölleme yeteneği kazanır. Tuba uterinanın epitelindeki sekresyon ürünleri akrozom yüzeyini kaplayan glikoprotein örtüyü ve seminal proteinlerini ortadan kaldırır. Aktivasyon yeteneği kazanır (Eşrefoğlu, 2017; Sadler, 2020).

2.5 Olgun Spermin Yapısı

İnsan sperminin yapısı baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Şekil 9).

2.5.1 Sperm baş yapısı

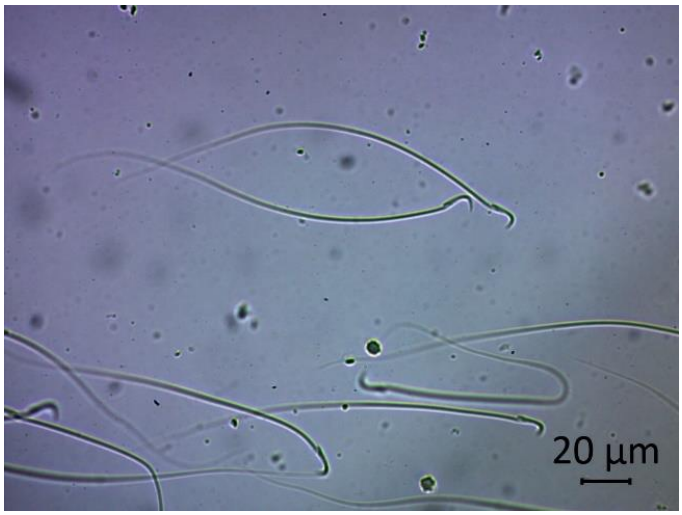
Spermin baş kısmının büyük çoğunluğunu paternal DNA'nın oluşturduğu yoğun bir çekirdek oluşturur. Çekirdeğin ön yüzünde hidrolitik enzimler içeren akrozomla çevrilidir. Bu enzimler akrozin ve hyolurinidaz başta olmak üzere asit fosfataz, aril sülfataz, kollajen yapılarıdır (Moore, 2016).



Şekil 9. İnsan spermin yapısı (Ross ve Pawlina, 2017)



Şekil 10. Sıçan spermi yapısı (Rat Sperm Morphological Assessment, 2000)



Şekil 11. Sıçan spermi spermac boyama (40X)

2.5.2 Kuyruk yapısı ve hareketlilik

Kuyruk kısmı kendi içinde dört parçaya ayrılır. Baş ve kuyruğun bağlantısını sağlayan boyun kısmı sentriyolden oluşan yoğun bir fibröz dokudur. Bu özelleşmiş kısım gerilim yaratmadan bükülmeyi kolaylaştırır ve sperm hareketliliğini sağlar. Orta parça 7 μm uzunluğunda mitokondrilerin bulunduğu bölgedir ve hareketlilik için enerji sağlar (Ross ve Pawlina, 2017). Esas parça yaklaşık 40 μm uzunluğunda 0,5 μm çapında içten dışa aksonem, dış fibriller, fibröz kılıf ve plazma membranından oluşur. Aksonem, kuyruk hareketini sağlayan temel yapıdır.

2.5.3 Sperm morfolojisi

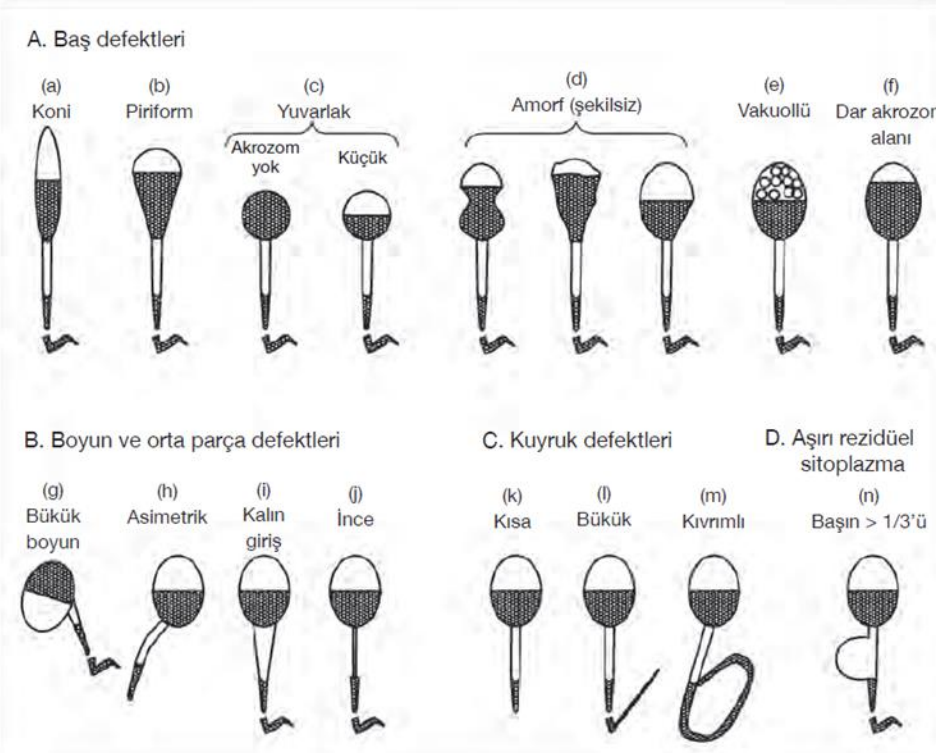
İnsan sperminin morfolojik değerlendirmesi için 1987 tarihinde Kruger kriterleri olarak bilinen Kesin Morfolojik Kriterler kullanılmaktadır (Şekil 12). Normal morfolojiye sahip sperm hücresinin kriterleri şu şekilde tanımlanmaktadır:

Baş: Sınırları düzgün, oval şekilli, başın %40-70'ini akrozom oluşturmalıdır. Baş bölgesinde bulunan vakuoller %20'den büyük olmamalı ve postakrozomal bölgede bulunmamalıdır. Baş anomalileri büyük, küçük, yuvarlak, uzun, sivri, amorf, çok nukleuslu, vakuollü, piriform ve çift başlı olarak sınıflandırılmıştır.

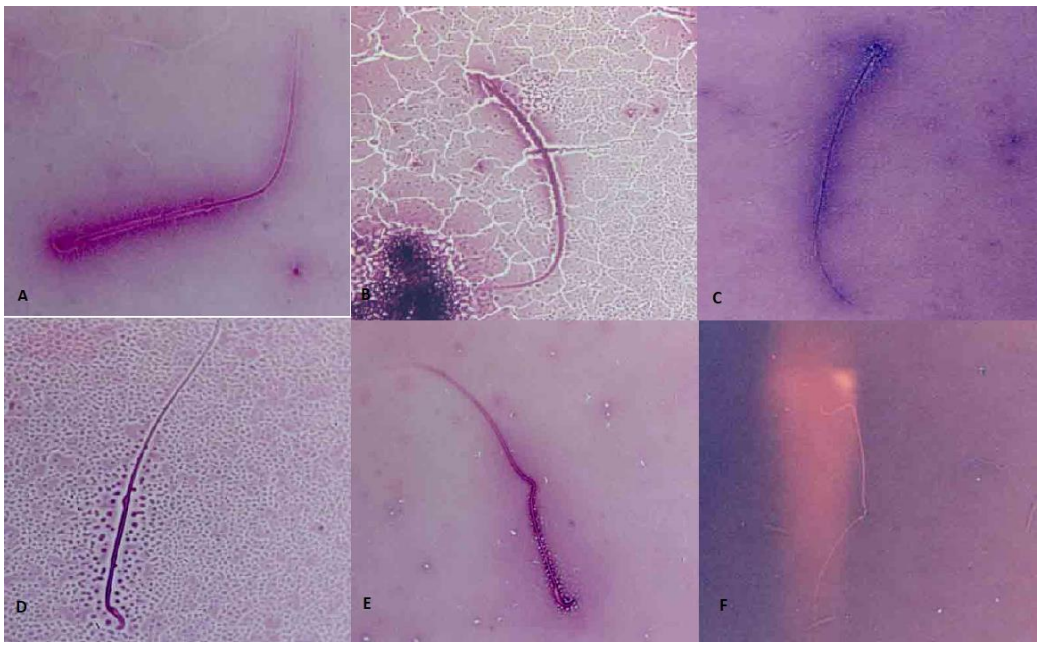
Orta parça: Baş kısmının uzunluğuna benzer uzunlukta ince ve düzenli yapıdadır. Baş ve orta parçanın ekseni aynı hizada olmalıdır. Bağlantı kısmının çok ince ya da kıvrılmış olması, kalın ve düzensiz olması anomali olarak kabul edilir.

Esas parça: Yaklaşık 50-55 μm uzunluğunda olmalı ve uzunluğu boyunca kalınlığı değişmemelidir. Kısa ya da sarmal olması, birden fazla sayıda olması, keskin açılı veya kırık olması anomali göstergesidir (Björndahl vd., 2021).

İnsan spermiyle benzerlik göstermekle birlikte Şekil 10'da ve Şekil 11'de görüldüğü gibi sıçan spermlerinde özellikle baş kısmında morfolojik farklılıklar olduğu bilinmektedir (*Rat Sperm Morphological Assessment*, 2000).



Şekil 12. İnsan sperm morfolojik anomalileri (Björndahl vd., 2021)



Şekil 13. Sıçan sperm anomalileri (A) Başsız sperm (B) Düzleşmiş başlı sperm (C) Toplu iğne başlı sperm (D) Kırık boyunlu sperm (E) Kırık kuyruklu sperm (F) Çoklu anomalili sperm (Rat Sperm Morphological Assessment, 2000)

2.6 Sperm Kromatin Yapısı ve DNA Fragmantasyonu

Sperm hücrelerinde kromatin yapısı somatik hücrelerden farklı olarak daha kompakt yapıdadır. Bu yoğunlaşma spermiyogenez sırasında spermatid nuklesunun yeniden düzenlenmesi sırasında gerçekleşir ve H1, H2A, H2B ve H4 somatik histon proteinleriyle küçük arginin açısından zengin protamin 1 ve protamin 2 denilen proteinlerin yer değiştirmesi sonucu meydana gelir. Memelilerde P1 ve P2 olarak adlandırılan iki protaminin en çok çalışan protaminler olduğu ve primatlarda ve birçok kemirgende normal sperm fonksiyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Erken embriyonik gelişimde önemli rolü olan sperm genomundaki histonların %10-15'i paketlenmiş olarak kalır (Balhorn, 2007).

Sperm DNA fragmantasyonu çeşitli faktörler nedeniyle sperm kromatin bütünlüğünün bozulması durumudur. Robinson ve arkadaşlarının (2012) çalışmalarda çeşitli nedenlerden dolayı sperm DNA fragmantasyonu geliştiği görülmektedir:

"- Spermatogenez sırasında hücrelerin apoptoz mekanizmalarının bozulması
- Spermiyogenezde kromatin remodelling sırasında oluşan kol kırıkları
- Serbest oksijen radikalleri nedeniyle
-Endojen endonukleazlar kaynaklı indüklenme
-Kemoterapi ve radyoterapi kaynaklı indüklenme
-Sigara kullanımı ve çevresel faktörler nedeniyle" (s.1-2).

DNA fragmantasyonuna neden olan önemli faktör anormal kromatin paketlenmesi, serbest oksijen radikalleri ve bozulan apoptoz mekanizmasıdır (Agarwal ve Said, 2003).

2.6.1 Serbest oksijen radikallerinin oluşumuna bağlı hasarlar

Oksidatif stres, sağlıklı organizmada homeostazisin sürdürülmesinde birbirini dengeleyen oksidan-antioksidan sistem dengesinin bozulup oksidan sürecin artmasıyla lipit peroksidasyonu ve süperoksit ürünlerinin organizmada birikmesi sonucu oluşan hücre hasarı olarak tanımlanır (Wu, Huang, Tsai, Lui ve Liu, 2004). Oksidatif stresin artması organizmada DNA, lipit, protein gibi biyomoleküllerin yapısında hasar oluşturmaktadır. Oksidatif hasar nedeniyle oluşan DNA kırıkları onarılmazsa

mutasyonlara neden olmaktadır. Sperm somatik hücrelerden farklı olarak mükemmel sıkıştırılmış bir kromatin yapısına sahiptir. Bununla birlikte sperm DNA'sı serbest oksijen radikalleri (SOR) için substrat görevi gören bol miktarda çoklu doymamış yağ asidi içerdiğinden ve onarım mekanizmaları olmamasından kaynaklı olarak oksidatif hasara karşı yüksek duyarlılıktadır (Garrido vd., 2004; Lewis ve Agbaje, 2008).

Oksijen yıkım ürünü olan SOR hücre işlevi ve yaşamı için zararlı etkiler göstermektedir (de Lamirande ve Gagnon, 1995). Spermatozoadaki oksidatif stres hücre içi ve dışında SOR seviyesinin antioksidan kapasiteyi aşması nedeniyle oluşmaktadır (Hammoud vd., 2007). Artmış SOR seviyesinin sperm motilitesini etkilediği gösterilmiştir (Agarwal, Ikemoto ve Loughlin, 1994). SOR'a maruz kalan spermatozoaların doymamış yağ oranı %20 oranında azalır (de Lamirande, Jiang, Zini, Kodama, ve Gagnon, 1997). Yağ asidindeki azalma nedeniyle membranda meydana gelecek birleşme gerçekleştirilemez (Hengartner, 2000a). Bunların yanı sıra SOR enzimleri inaktive ederek yapısal DNA fragmantasyonuna sebep olur ve sonuç olarak hücre apoptoza gider (Lopes vd., 1998). Hücre içi antioksidan savunma mekanizmasında Süperoksit Dismutaz (SOD) O_2'yi normale getirirken Katalaz (CAT), Glutyatyon Peroksidaz (GPx) ve Peroksiredoksinler (PRDXs) H_2O_2'yi normale getirir; hücre dışında transferrin, laktoferrin, hemopeksin, seruloplazmin, albümin ve haptoglobin etkindir.

2.6.2 Apoptoz

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz hücrelerin normal gelişim sürecinde ya da biyotik ve abiyotik faktörlerin yarattığı strese maruz kaldıklarında ortaya çıkan, genetik faktörler tarafından kontrol edilen fizyolojik bir süreçtir. Apoptoz, organizmadaki hücre sayısının kontrol altında tutulması, hasarlı ve tehlike oluşturabilecek hücrelerin yok edilmesi gibi alanlarda savunma mekanizması olarak çalışır. Büyüme faktör eksiklikleri, viral enfeksiyonlar, hipoksi, sitotoksik kimyasallar ve ışınların sebep olduğu DNA fragmantasyonu gibi sebeplerle apoptoz tetiklenebilir (Ünal, 2012).

Memelilerde hücre içi yol ve hücre dışı yol olarak iki mekanizma tarafından apoptotik sinyal yolağı düzenlenir. Bu yolaklardaki hücre ölümünün nedeni proteinlerin yıkımının sorumlusu kaspazlardır (Ünal, 2012).

2.6.2.1 Hücre içi (mitokondriyal) yol

Hücre içi yol genellikle hücresel döngüde oluşan hata, hücre dışı matriksten uzaklaşma, oksijen yetmezliği, pH değişimi, SOR oluşumu, DNA hasarı, hücre içi Ca^{+2} artışı ve yaşamsal faktörlerin yok olmasıyla yoğun stres sonucu ortaya çıkar. Mitokondrideki kaspazların aktive olması sonucu gerçekleşir (Hengartner, 2000b; Ünal, 2012)

2.6.2.2 Hücre dışı yol

Hücre dış yüzeyinde bulunan Fas, TNFR1, TRAILR1/TRAILR2 gibi özel apoptotik reseptörlerine uyarıcı FasL, TNFα, TRAIL ligandlarının bağlanması sonucu apoptoz yolağı indüklenir.

2.7 Antineoplastik Tedaviler

Kanser tedavisinde halen en çok uygulanan tedavi kemoterapi olarak anılan ve antineoplastik ilaçların kullanıldığı tedavi protokolüdür. Antineoplastik ilaçlar sitotoksik özelliktedir. Sitotoksik ilaçlar kanser hücrelerinin spesifik hücre yapısını ve metabolik yolaklarını bozarak antitümör etki gösterirler. Sitotoksik ilaçlar genellikle alkilleyici ajanlar, vinka alkoloidleri, hormon ve hormon antagonistleri, antimetabolitler, monoklonal antikorlar ve antibiyotikler şeklinde sınıflandırılırlar (Block vd., 2007). Antineoplastik ajanların birçoğu nükleotit sentezini baskılayarak hücre çoğalmasını engeller bu nedenle malign hücrelerin yanı sıra kemik iliği, gastrointestinal sistem, deri ve gonadlar gibi dokuları da etkilerler. Bununla birlikte sitotoksik ilaç tedavisi alan hastalarda polimorfonükleer lökositlerin H_2O_2 ve O_2 üretimini tedavi öncesine göre belirgin düzeyde arttırdığı gösterilmiştir (Weijl, Cleton ve Osanto, 1997). İlaçlar tek olarak kullanılmakla birlikte sıklıkla kombine şekilde verilmektedir. En yaygın kullanılanlar bleomisin, etoposit, cis-platin (BEP) tedavisidir (Einhorn ve Foster, 2006; Kopp vd., 2006).

2.7.1 Bleomisin

Bleomisin, Streptomyces Verticillus bakterisinden elde edilen, antitümör antibiyotikler grubunda yer alan bir antineoplastiktir. Bu grup ilaçlar kanser hücresinin DNA-RNA sentezini baskılayarak hücrenin büyümesini ve bölünmesini engeller. Radyasyon

toksisitesini arttırma özelliğinden dolayı radyoterapi alan hastalarda uygulanmaz. Serviks kanseri, Hodgkin lenfoma, non-Hodgkin lenfoma, skuamoz hücreli baş, boyun kanserleri ve testis kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Hecht, 2000; Mack, DeHart, Verkamp, Lewis ve Crary, 2021).

2.7.2 Etoposit

Etoposit alkoloidlerden elde edilen vinka alkoloidler grubunda yer alan antineoplastik ilaçlardandır. Bu grupta yer alan ilaçlar hücre bölünmesi sırasında metafaz evresine geçişi engeller RNA sentezini engeller ve böylelikle hücre ölümüne neden olurlar. Akciğer kanseri, lösemi, meme kanseri, over kanseri ve germ hücreli tümörlerin tedavisinde kullanılırlar (Meresse, Dechaux, Monneret ve Bertounesque, 2004; van Maanen, Retèl, de Vries ve Pinedo, 1988; Zhang, Gou, Dupret, Chomienne ve Rodrigues-Lima, 2021).

2.7.3 Cis-Platin

Cis-platin alkilleyici ajanlar sınıfında yer alır ilk metal antitümör ilaçtır. Bu grup hücre siklusuna özel olmayıp DNA transkripsiyonunu engeller ve protein sentezini baskılar. Hem hızlı hem de yavaş bölünen malign tümörlerde etkilidir (Loehrer ve Einhorn, 1984; St. Germain vd., 2010; Wiltshaw, 1979).

2.8 Antioksidan Tedaviler

SOR oluşumunu önlemek, bu maddelerin organizmada oluşturduğu hasarı engellemek ve detoksifikasyon sağlamakla görevli savunma mekanizmasına antioksidanlar adı verilir (Halliwell, 2009). SOR ile hızlıca reaksiyona girerek peroksidasyonun ve otooksidasyonun ilerlemesini önler. Antioksidanların görevleri arasında SOR'nin fazlasını etkisizleştirme, hücreleri SOR'nin toksik etkilerinden koruma sayılabilmektedir (Pham-Huy, 2008). Antioksidanlar serbest oksijen radikallerinin oluşmasını engelleyerek ya da oluşanları etkisiz hale getirerek hücrelerin zarar görmesini önler (Oborna vd., 2009).

2.8.1 Erkek infertilitesinde antioksidanlar

SOR sperm hareketliliği için düşük miktarda gerekmekle birlikte aşırı miktarda artışı sperm kalitesini, fonksiyonunu ve canlılığını olumsuz etkiler ve infertiliteye sebep olur

(Kefer, Agarwal ve Sabanegh, 2009). SOR'nin aşırı artışı sperm DNA bütünlüğüne zarar verir ayrıca testosteron konsantrasyonunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Agarwal ve Saleh, 2002). Yapılan bazı çalışmalar göstermiştir ki antioksidanlar DNA ve metabolizmada olumsuz etkileri olan serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirmektedir (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy ve De, 2010). BEP tedavisinin testisler üzerindeki olumsuz etkilerini tamamen ortadan kaldırmasa da azaltmak için onaylanmış antioksidan tedavi protokolleri bulunmaktadır (Kilarkaje, Mousa, Al-Bader ve Khan, 2013). Melatonin, arı sütü, çinko, vitamin E ve kurkumin gibi antioksidan özellikleri bilinen maddelerin bleomisinle veya l-tiroksinle indüklenen hayvan çalışmalarında testis toksisitesini önlemeye yardımcı olduğu ve DNA bütünlüğünü koruduğu gösterilmiştir (Amirshahi vd., 2014; Khadivi vd., 2020; Moradi vd., 2021; Sahoo vd., 2008). Erkek infertilitesinin önlemesi ve normal sperm motilitesinin ve morfolojisinin sağlanmasında etkili bazı ilaç takviyesi ve antioksidanların olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Askorbik asit, ko-enzim Q10, GSH, L-karnitine, omega-3, selenyum, çinko (Zn), vitamin E sıklıkla kullanılan antioksidanlardandır (Wong vd., 2002; Yao ve Mills, 2016).

2.8.2 Glutatyon

Glutatyon (GSH) hücre içinde indirgeyici özelliği olan glutamik asit ve sistein glisin olarak sentezlenen bir tripeptitdir. GSH, serbest radikallerin varlığının neden olduğu oksidatif stresle mücadele etmek için hücreler ve dokular tarafından kullanılan doğal olarak oluşan antioksidan savunma stratejisinin bir parçası, koruyucu özelliği olan önemli bir antioksidandır. Glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), GPx, katalaz ve sitokrom oksidaz organizmayı oksidatif stresten koruyan önemli moleküllerdir (Garrido vd., 2004; Meister ve Anderson, 1983). Bu moleküller klinik pratikte oksidatif stresi azaltmak ve antioksidan aktivite oluşturmak için kullanılmaktadır (Wu vd., 2004). Hücresel düzeydeki eksikliği birçok hastalığa sebep olurken mitokondriyal dejenerasyon nedeniyle çeşitli dokularda hücresel hasar oluşturmaktadır (Aksoy, 2002; Narin, 2012; Sciuto, 1997). GSH, GPx enziminin önemli bir parçasıdır. GPx doğal olarak oluşan epididimis ve testislerde lipit peroksite (LPO) karşı savunma mekanizmasında önemli yeri olan bir antioksidandır. LPO ve H_2O_2'yi temizleyerek lipit bileşenlerini ve böylece sperm canlılığı ile hareketliliğini korur (Garrido vd., 2004).

3. YÖNTEM

3.1 BEP Protokolü ve Antioksidan tedavisi

3.1.1 Ön çalışmayla antineoplastik ilaç dozlarının belirlenmesi

Ön çalışmada olgun 12 haftalık 300-500 g ağırlığında Sprague-Dawley ırkı 4 sıçan kullanıldı. Günlük olarak tartılıp ilaç dozları hazırlandı. Sıçanlar kemoterapötik ajanların literatürdeki dozların uygunluğunu değerlendirmek amacıyla ikişerli iki gruba ayrıldı. Bir gruba literatürde belirtilen her kürün 1-5 günlerinde 1,5 mg/kg cis platin ve 7,5 mg/kg etoposid ve 2., 9. ve 16. günlerinde 0,75 mg/kg bleomisin, diğer gruba aynı dozların 1/3'ü oranında 1-5 günlerinde 0,5 mg/kg cis platin ve 2,5 mg/kg etoposid ve 2., 9. ve 16. günlerinde 0,25 mg/kg bleomisin enjeksiyonlar arası 30 dk olacak şekilde intraperitonal (IP) enjeksiyonla verildi. Deneklerde literatür dozu tedavi başladıktan sonra 5. günde, literatür dozunun 1/3 ü tedavinin 6. haftasında %100 mortaliteye sebep olduğundan literatürdeki dozun 1/9 u kullanıldı (Kilarkaje vd., 2013; Razavi vd., 2019).

3.1.2 Deney grupları ve ilaç uygulamaları

Çalışmamızda üreme çağında olgun 12 haftalık 300-500 g ağırlığında Sprague-Dawley ırkı 24 sıçan alındı. Sıçanlar Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları araştırma merkezinde (MÜDEHAM) üretildi. Her kafeste 4 sıçan olacak şekilde 18-24 ˚C sıcaklıkta, %50-60 nem oranında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık koşullarda tümü aynı odada, laboratuvar pelet yemi ve su devamlı kullanılabilir durumda tutuldu. Deneysel protokol MÜHADYEK tarafından verilen 2021.09.01 protokol kodlu etik rapor doğrultusunda uygulandı.

Erkek sıçanlar rastgele her grupta 8 sıçan olacak şekilde kontrol grubu, BEP grubu ve BEP+GSH grubu olarak 3 gruba ayrıldı. 9 hafta boyunca yaptığımız ön çalışmada belirlenen ilaç dozları uygulandı. Yapılan çalışmalar incelendiğinde insanlar için tasarlanmış 3 kür tedavi protokolü hayvanlara göre hesaplandığında bir doz için bleomisin 1x1,5 mg/kg, etoposid 15 mg/kg, cis-platin 3 mg/kg kullanıldığı görüldü. Bununla birlikte 2013 yılında yapılan başka bir çalışmada belirtilen dozların sıçanlarda

%100 mortaliteye sebep olduğu gösterildiğinden, Razavi ve arkadaşları ile Kilarkaje ve arkadaşlarının yaptığı iki çalışmada belirtilen tedavi dozunun yarısının kullanıldığı görüldü (Kilarkaje vd., 2013; Marcon vd., 2008; Razavi vd., 2019).

BEP grubundaki sıçanlara her bir kür 21 gün olacak şekilde 3 kür şeklinde tedavi protokolü düzenlendi, Tablo 1'de gösterildiği gibi her kürün 1-5 günlerinde 0,17 mg/kg cis platin ve 0,83 mg/kg etoposid ve 2., 9. ve 16. günlerinde 0,083 mg/kg bleomisin enjeksiyonlar arası 30 dk olacak şekilde IP enjeksiyonla verildi. Kontrol grubuna, BEP protokol grubuna bleomisin, etoposid ve cis-platin uygulanan zamanlarda herhangi bir ilaç içermeyen %0,9 NaCl solüsyonu enjekte edildi. BEP+GSH grubuna BEP grubunda olduğu gibi 3 kür toplamda 9 hafta BEP protokolü ve 9 hafta boyunca GSH 200 mg/kg haftada 2 kez IP olarak uygulandı (Munday, 1989; Van Dam vd., 2001). Ayrıca kontrol grubu ve BEP grubundaki hayvanlara BEP+GSH grubuna GSH uygulandığı günlerde %0,9 NaCl solüsyonu IP olarak enjeksiyonlar arası 30 dk olacak şekilde verildi (Şekil 14) (Khadivi vd., 2020). Tüm ilaçlar %0,9 NaCl solüsyonu ile sulandırıldı. Kemoterapötik ajanlar class II biyogüvenlik kabininde özel giysi ve ekipmanlar kullanılarak hazırlandı (Şekil 14).



Şekil 14. Deneklere ilaçların hazırlanıp uygulanması

Tablo 1. Örneklem grupları ve tedavi protokolleri

KÜR		Kontrol Grubu (n=8)							BEP grubu (n=8)							BEP+GSH (n=8)						
	HAFTA	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1	1	%0,9 NaCl (IP) %0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP) %0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)			E-P (IP) %0,9 NaCl (IP)	B-E-P (IP)	E-P (IP)	E-P (IP) %0,9 NaCl (IP)	E-P (IP)			E-P-(IP) GSH (IP)	B-E-P (IP)	E-P (IP)	E-P-(IP) GSH (IP)	E-P (IP)		
	2	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)		%0,9 NaCl (IP)				%0,9 NaCl (IP)	B (IP)		%0,9 NaCl (IP)				GSH (IP)	B (IP)		GSH (IP)			
	3	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)		%0,9 NaCl (IP)				%0,9 NaCl (IP)	B (IP)		%0,9 NaCl (IP)				GSH (IP)	B (IP)		GSH (IP)			
2	4	%0,9 NaCl (IP) %0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP) %0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)			E-P (IP) %0,9 NaCl (IP)	B-E-P (IP)	E-P (IP)	E-P (IP) %0,9 NaCl (IP)	E-P (IP)			E-P (IP) GSH (IP)	B-E-P (IP)	E-P (IP)	E-P(IP) GSH (IP)	E-P (IP)		
	5	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)		%0,9 NaCl (IP)				%0,9 NaCl (IP)	B (IP)		%0,9 NaCl (IP)				GSH (IP)	B (IP)		GSH (IP)			
	6	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)		%0,9 NaCl (IP)				%0,9 NaCl (IP)	B (IP)		%0,9 NaCl (IP)				GSH (IP)	B (IP)		GSH (IP)			
3	7	%0,9 NaCl (IP) %0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP) %0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)			E-P (IP) %0,9 NaCl (IP))	B-E-P (IP)	E-P (IP)	E-P (IP) %0,9 NaCl (IP)	E-P (IP)			E-P (IP) GSH (IP)	B-E-P (IP)	E-P (IP)	E-P (IP) GSH (IP)	E-P (IP)		
	8	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)		%0,9 NaCl (IP)				%0,9 NaCl (IP)	B		%0,9 NaCl (IP)				GSH (IP)	B (IP)		GSH (IP)			
	9	%0,9 NaCl (IP)	%0,9 NaCl (IP)		%0,9 NaCl (IP)				%0,9 NaCl (IP)	B		%0,9 NaCl (IP)				GSH (IP)	B (IP)		GSH (IP)			

NaCl: Sodyum klorür, E: Etoposid, P: Cis-Platin, B: Bleomisin, GSH: Glutatyon, IP: Intraperitonal

3.2 Dokuların Alınması

9 hafta sonunda tartılarak vücut ağırlıkları kaydedilen tüm denekler 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin yapılarak anestezi altında sakrifiye edildikten sonra testis ve epididimisleri çıkarılıp buz üzerinde petri kabına alındı (Şekil 15). Testis ve epididimis ağırlıkları kaydedildi. Sıçanların vücut ağırlığı ve sağ-sol testis ağırlıkları aşağıdaki formülle hesaplandı ve her bir hayvan için ağırlık farkından dolayı oluşabilecek testis ağırlıkları farkını standardize etmek için Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) değerleri belirlendi (Sahinturk, Guclu ve Baycu, 2007).

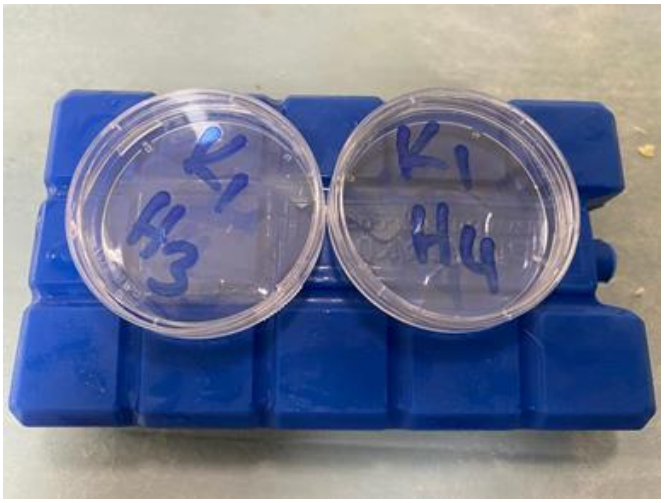
TAİ: [(sağ+sol testis ağırlıkları toplamı) /vücut ağırlığı] × 100

3.3 Sperm toplama ve değerlendirmesi

Çıkarılan epididimisler tartımları yapıldıktan sonra Tablo 2'de gösterilen sırayla 1 ml global medyum (LifeGlobal®Media) içinde kıyım yöntemiyle küçük parçalara ayrıldı. 37°C de 15 dk boyunca inkübe edilip spermlerin medyuma akması sağlandı. İnkübasyon sonrasında epididim parçaları ayrılarak sıvı kısmı ependorflara alındı.

Tablo 2. Epididimisten sperm elde edilmesi

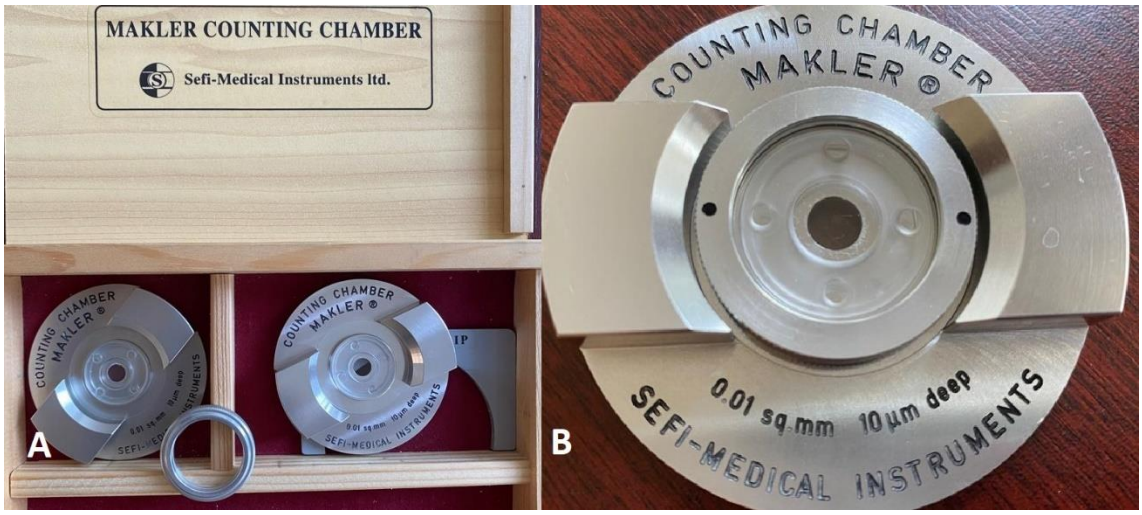
1) 1 ml global medyum içinde epididim örnekleri kıyıldı 15 dk 37ºC de inkübe edildi.
2) 5 µl örneğe 45 µl PBS konularak (1/10) oranında sulandırıldı 10 µl alınıp makler kamerasında sayım yapıldı.
3) Elde edilen stok örnek 3 ependorfa bölünüp 2 kez her birine 1 ml PBS eklenerek 400 g 7 dk santrifüj edildi.



Şekil 15. Epididimislerin alınması

3.3.1 Makler kamerası ile sperm sayımı

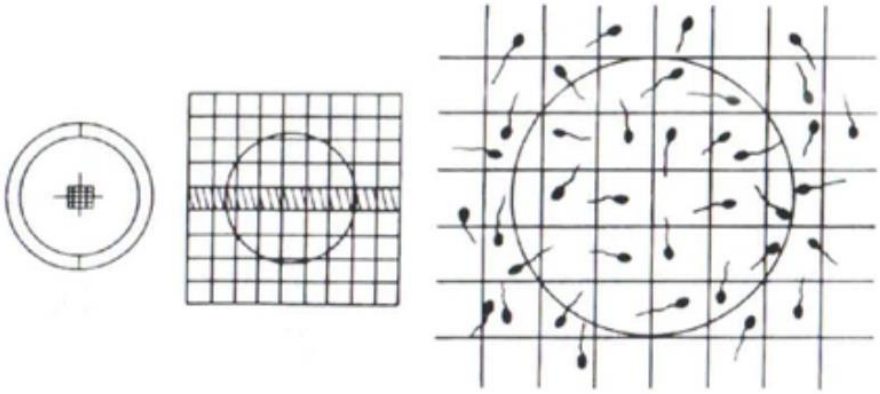
Makler kamerası Prof. Dr. Ammon Makler tarafından ışık mikroskobunda 20X büyütmede sperm sayımı yapmak üzere geliştirilmiştir. Kamera derinliği 10 µ dur ve bu derinlik spermlerin tek düzlemde hareketine olanak sağlayarak motilite değerlendirmesini kolaylaştırmaktadır. İki optik camdan oluşur ve üst cam 0,1x0,1 mm'lik toplam 100 kareden oluşur (Şekil 16).



Şekil 16. Makler kamerası

Çalışmamızda alınan sperm örnekleri 15 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra sayı olarak çok yoğun olduğundan 1/10 oranında PBS (fosfat tamponlu tuz) ile sulandırılıp süspansiyondan 10 µl Makler kamerasının lamı üzerine konularak Carl Zeiss ışık

mikroskobunda rastgele yatay 10 kare, dikey 10 karedeki spermler sayılıp ortalaması alındı (Şekil 17). Yatay ve dikey 10 karede benzer sonuçlar bulundu. Sperm başları kare içinde olan tüm spermler sayıma dahil edildi. Ortaya çıkan sonuç ilk aşamada 1/10 seyreltildiğinden önce 10 ile ardından 10^6 ile çarpılarak mililitredeki sperm sayısı hesaplandı. Kamera her örnek sonrasında yıkanıp cam temizleme mendiliyle temizlendi ve bir sonraki örnek için hazır hale getirildi.



Şekil 17. Makler kamerası mikroskop görünüm
(https://us.ivfstore.com/products/makler-sperm-counting-chamber)

3.3.2 Sperm morfolojisi değerlendirme

Morfoloji değerlendirmesi için Spermac Stain boyama seti kullanıldı. Sperm morfolojisinin değerlendirmesi için inkübe edilen örneklerden her denek için ayrı ayrı lam üzerine yayma yapılıp 25°C de 15-20 dk da kurutuldu. Hazırlanan lamlar Spermac fiksatif solüsyonu içerisinde 5 dk boyunca fikse edildi. Örnekler fikse edildikten sonra 10 kez distile suya daldırıp çıkarılarak yıkandı kurutma kâğıdı ile fazla suyu alındı. Spermac A boyasında 60 sn bekletildi ardından distile suya 10 kez daldırıp çıkarılarak boya uzaklaştırıldı kurutma kâğıdı ile fazla suyu alındı. Sonrasında Spermac B boyasında 45 sn bekletildikten sonra distile suya 10 kez daldırıp çıkarılarak boya uzaklaştırıldı kurutma kâğıdı ile fazla suyu alındı. Spermac C boyasında 45 sn bekletildi ardından distile suya 10 kez daldırıp çıkarılarak yıkandı kurutma kâğıdı ile fazla suyu alındı. Oda sıcaklığında 15 dk kurumaya bırakıldı (Şekil 18). Lamlar Spermac Stain boya setiyle muamele edildikten sonra Zeiss ışık mikroskobunda 40X büyütmede değerlendirildi. Her bir denek için 200 sperm sayıldı ve Industrial Reproductive Toxicology Discussion grup (IRDG) Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) grup tarafından hazırlanan Sıçan Sperm

Morfolojik Değerlendirmesi kılavuzuna göre baş, boyun, kuyruk anomalisi açısından Şekil 13'te ki gibi değerlendirildi (*Rat Sperm Morphological Assessment*, 2000). Farklı morfolojiye sahip spermler Zeiss mikroskopta 40X büyütmede görüntülendi.



Şekil 18. Spermac boyama yöntemi

3.3.3 TUNEL boyama için sperm fiksasyonu ve örnek hazırlama

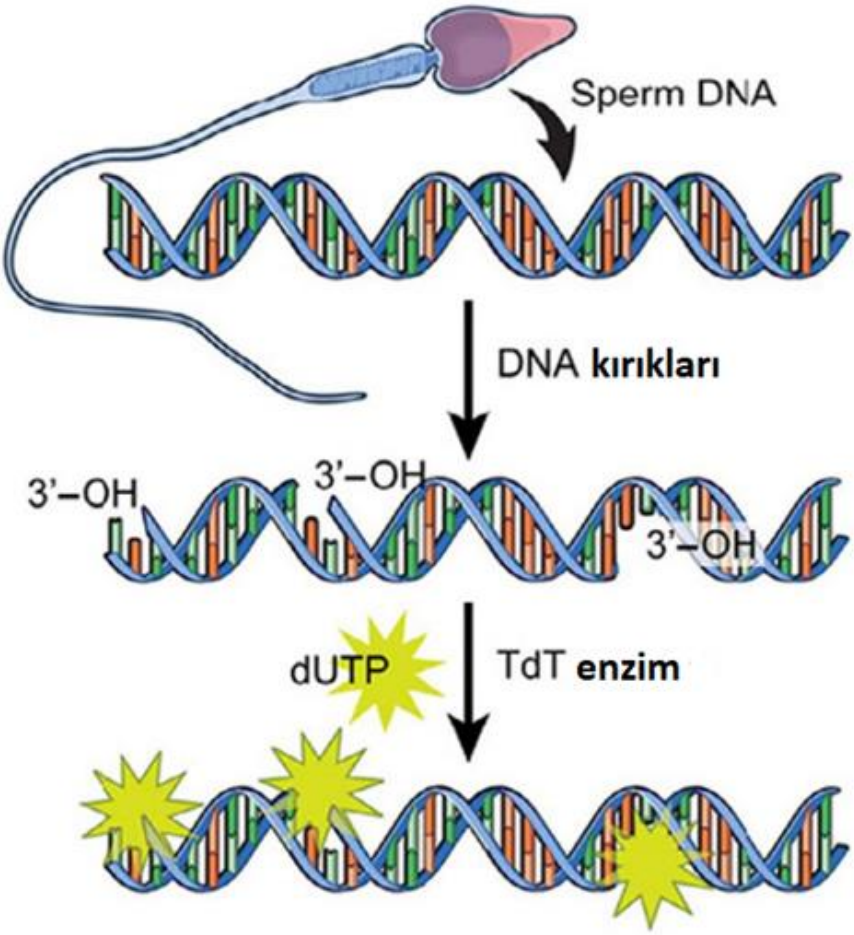
Sperm DNA fragmantasyon oranının belirlenmesi için deneklerin epididimislerinden Tablo 3' de görüldüğü gibi sperm elde edilip TUNEL Assay Kit-FITC (ab66108) protokolüne uygun olarak fiksasyon yapıldı.

Tablo 3. TUNEL boyama için fiksasyon yöntemi

FİKSASYON
1) 1 ml %1 lik Paraformaldehit (PFA) içinde 15 dk -20ºC de bekletildi.
2) 400g hızda 7 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı.
3) 2 kez 1 ml PBS ile yıkanıp 400g hızda 7 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
4) %70 Soğuk 1ml etanolle -20 ºC de dondurulduu.

3.3.4 TUNEL yöntemi ile fragmantasyon tayini

TUNEL yöntemi direkt olarak DNA kırıklarını ölçen ve yaygın olarak kullanılan bir metottur (Baskaran vd., 2019). Düşük oranının tahmininde, gebelik oranı ve doğum oranının ön görülmesinde prediktif bir test olduğu gösterilmiştir (Osman, Alsomait, Seshadri, El-Toukhy ve Khalaf, 2015; Robinson vd., 2012). Yani TUNEL sadece erkek infertilitesinin belirlenmesinde değil YÜT sonuçlarının da ön görücüsü olabilir (Sharma, Iovine, Agarwal ve Henkel, 2021). Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimiyle katalize edilen bir reaksiyonla tek ya da çift zincir kırıklarına nonizotopik işaretli nükleotidler (dUTP) birleştirilerek DNA kırıkları işaretlenir (Şekil 19). Başta somatik hücrelerdeki DNA fragmantasyonlarının belirlenmesinde kullanılmış, sonrasında spermatozoada kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Mitchell, De Iuliis, ve Aitken, 2011). Spermin floresan yoğunluğu floresan mikroskop ya da flow sitometri yardımıyla ölçülür (Sharma vd., 2021).



Şekil 19. TUNEL yöntemi ile DNA boyama şeması (Sharma vd., 2021)

Çalışmamızda sperm DNA fragmantasyonunu belirlemek için TUNEL Assay Kit – FITC-ab66108 (ABCAM) kullanıldı. %1 PFA ile fikse edilip -20º C de 1 ml etanol içerisinde dondurulan sperm hücreleri çalkalanarak yeniden süspanse edildi. 300g hızda 5 dk santrifüj edilerek etanol uzaklaştırıldı. Peletin üzerine TUNEL kiti içerisinde bulunan yıkama solüsyonundan 1 ml ilave edilip 300g hızda 5 dk santifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Tablo 4'te gösterildiği gibi hazırlanmış 50 µl DNA boyama solüsyonu içinde yeniden süspanse edildi:

Tablo 4. TUNEL kiti hazırlama protokolü (TUNEL Assay Kit-FITC (ab66108))

DNA Boyama Solüsyonu	**1 assay**	**10 assay**
Reaksiyon Tampon Çözeltisi	10 µl	100 µl
TdT Enzim	0,75 µl	7,5 µl
FITC-dUTP	8 µl	80 µl
ddH_2O	32,25 µl	322,5 µl
Toplam Hacim	51 µl	510 µl

Sperm hücreleri hazırlanan DNA boyama solüsyonu içinde karanlıkta 60 dakika 37°C su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında hücreleri tekrar süspanse etmek için her 15 dk da bir ependorf hafifçe çalkalandı. İnkübasyon sonrasında her ependorfa 1 ml durulama solüsyonu eklendi ve 300g hızda 5 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı bu işlem 2 kez tekrar edildi. Hücre peleti, 0,5 ml propidium iodide/RNase A Solution içinde yeniden süspanse edildi ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Lazer taramalı konfokal mikroskopta 200 hücre floresan ışıma sayımı yapılarak değerlendirildi.

3.4 Testis Histomorfolojisi

Tüm sıçanların testis dokusu ağırlık ölçüm işleminden sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi, doku takibi yapılıp ardından parafin bloklara gömüldü (Tablo 5). Parafin bloklardan mikrotom ile 2-3 µ'luk kesitler alınarak genel histopatolojik değerlendirme için Hemotoksilen-Eozin (H&E) boyaması yapıldı (Tablo 6). Elde edilen preparatların Zeiss ışık mikroskobunda 40X büyütmede Johnsen skorlaması ile değerlendirmesi yapıldı (Tablo 7).

3.4.1 Doku takibi

Sıçanların testis dokuları ışık mikroskobunda incelenmek üzere alındıktan sonra Tablo 5'te yer alan doku takip aşamalarından geçirildi.

Tablo 5. Doku takip aşamaları

	İşlemler	**Süre**
1.	%10 formaldehitle fiksasyon	1 gece
2.	Akar suda yıkama	1 saat
3.	%50 alkol	2 saat
4.	%70 alkol	2 saat
5.	%90 alkol	2 saat
6.	%96 alkol	2 saat
7.	%96 alkol	2 saat
8.	Absolu alkol-I	2 saat
9.	Absolu alkol-II	2 saat
10.	Ksilen	2 saat
11.	Parafine Gömme	

3.4.2 Hemotoksilen-Eozin (H&E) boyama

Fikse edilip parafine gömülü testis dokuları sitoplazma ve çekirdek incelemelerinin yapılması için Tablo 6'daki Hemotoksilen-Eozin boyama protokolü uygulandı.

Tablo 6. Hemotoksilen-Eozin (H&E) boyama yöntemi

1.	Etüv (60 ºC)	1 saat
2.	Ksilol (Şeffaflandırma)	2 x 5 dakika
3.	Absolu alkol-I	3 dakika
4.	Absolu alkol-II	3 dakika
5.	%96, %90, %70, %50 etil alkol serisinde geçirme	3'er dakika
6.	Akar suda yıkama	5 dakika
7.	Mayer's Hematoksilen	7-8 dakika
8.	Akar suda yıkama	5 dakika
9.	Eozin Y	4-5 dakika
10.	%50, %70, %90, %96 alkol	3'er dakika
11.	Absolu alkol-I	3 dakika
12.	Absolu alkol-II	3 dakika
13.	Ksilol	2 x 5 dakika
14.	Kapatma	

3.4.3 Seminifer tübül epitel kalınlığı ölçümü

Hemotoksilen-Eozin boyama yapılan kesitler Zeiss mikroskop altında görüntülendi. 10 farklı alandaki seminifer tübül epiteli 10X objektif ile 4 farklı yerden Zen programı (Zeiss®) ile ölçülüp ortalamaları alındı.

3.4.4 Johnsen skorlama

İncelenen Seminifer tübül kesitlerine verilen puanların toplamı, sayılan tübül sayısına bölünerek, Tablo 7'de gösterilen puanlama sistemine göre ortalama puan hesaplandı.

Tablo 7. Johnsen skorlama yöntemi

Skor	Histolojik Bulgular
10	Birçok spermatozoa bulunan tam bir spermatogenezis
9	Birçok spermatozoa var, germinal epitel bozuk ve lümen oblitere
8	Yalnız birkaç spermatozoa var (<5-10)
7	Spermatozoa yok, birçok spermatid var
6	Spermatozoa yok, yalnızca birkaç spermatid var (<5-10)
5	Spermatozoa/spermatid yok, çok sayıda spermatosit var
4	Yalnızca birkaç spermatosit var (<5), spermatid / spermatozoa yok
3	Germ hücresi olarak yalnızca spermatogonia mevcut
2	Tübüller içerisinde germ hücresi yok, sadece Sertoli hücreleri mevcut
1	Tübüller içerisinde hücre yok

3.5 Testosteron seviyesi ölçümü

9. haftada anestezi altında kardiyak kan alınarak sakrifiye edilen deneklerin kan örnekleri alındı. Rutin biyokimya tüpüne konulan kan örnekleri 3500 rpm hızda 15 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Özel bir veteriner teşhis ve analiz laboratuvarında firmanın önerdiği protokol izlenerek Immulite Kemilumunesans (Siemens Immulite® 2000) yöntemi ile 1 ml serumda testosteron düzeylerine bakıldı.

3.6 Araştırma Modeli

Çalışmamız Maltepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından MÜDEHAM'da prospektif çalışma olarak gerçekleştirildi. Deneklerin bakım ve tedavileri Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde (MÜDEHAM) yapıldı, sonrasında alınan doku örnekleri Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi (MÜKKAM) ve Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında incelendi.

3.7 Evren ve Örneklem

Bu çalışmada üreme çağında olgun 12 haftalık 300-500 g ağırlığında Sprague-Dawley ırkı 24 sıçan alındı. Erkek sıçanlar rastgele her grupta 8 sıçan olacak şekilde kontrol grubu, BEP protokol grubu ve BEP+GSH grubu olarak 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna sadece %0,9 NaCl uygulanırken, BEP ve BEP+GSH grubuna 9 hafta boyunca 3 kür halinde testis kanseri kemoterapi ilaç protokolü uygulandı.

3.8 Veriler ve Toplanması

Deney sonunda tüm denekler anestezi altında sakrifiye edilerek gerekli dokular alındı. Alınan dokuların gözlemsel, niceliksel, biyokimyasal ve mikroskopik incelemeleri 3 grupta karşılaştırılacak şekilde kayıt altına alındı.

3.9 Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması

İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 26 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, yüzde, minimum, maksimum)

kullanıldı. Nicel verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-wilk testi ve skewness, kurtosis değerlerine göre normal dağılım ve normal olmayan dağılım olarak belirlendi. Normal dağılım gösteren nicel değişkenlerin üç grup karşılaştırmalarında tek yönlü ANOVA testi ve gruplar arası ikili karşılaştırmalarında Tukey post-hoc testi; normal dağılım göstermeyen nicel değişkenlerin üç grup karşılaştırmalarında ise Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Nicel değişkenler arası ilişkilerin değerlendirilmesinde Pearson korelasyon analizi kullanıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 Vücut, testis ve epididimis ağırlıklarının değerlendirilmesi

Tablo 8'de gösterildiği gibi tüm gruplardaki sıçanların başlangıç vücut ağırlıkları, bitiş vücut ağırlıkları, ağırlık artışları, testis ağırlık indeksleri, testis ağırlıkları ve epididimis ağırlıkları karşılaştırıldı.

Tablo 8. Kontrol, BEP ve BEP+GSH gruplarında ağırlık değişimleri

		Kontrol	**BEP**	**BEP+GSH**	***p***
Başlangıç Ağırlıkları	*Min-Mak (Ort) ±Ss*	255-390 (323,50) ±15,93	280-380 (328,13) ±11,91	280-395 (338,13) ±13,33	*[a]0,749*
Bitiş Ağırlıkları	*Min-Mak (Ort) ±Ss*	340-490 (398,00) ±17,08	320-420 (374,50) ±11,75	320-425 (380,63) ±12,80	*[a]0,484*
Ağırlık Artışları	*Min-Mak (Ort) ±Ss*	32-116 (74,50) ±10,55	25-70 (46,38) ±5,58	30-51 (49,07) ±2,78	***[a]0,008***
Testis Ağırlık İndeksi	*Min-Mak (Ort) ±Ss*	0,86-1,09 (0,94) ±0,026	0,60-0,97 (0,81) ±0,045	0,70-0,86 (0,76) ±0,019	***[a]0,002***
Sol Testis Ağırlığı	*Min-Mak (Ort) ±Ss*	1,663-2,105 (1,87) ±0,057	1,541-1,924 (1,64) ±0,10	1,115-1,623 (1,47) ±0,058	***[a]0,000****
Sağ Testis Ağırlığı	*Min-Mak (Ort) ±Ss*	1,68-2,10 (1,86) ±0,06	1,48-1,70 (1,58) ±0,14	1,11-1,57 (1,41) ±0,05	***[a]0,000****
Sol Epididimis Ağırlığı	*Min-Mak (Ort) ±Ss*	0,60-1,21 (0,81) ±0,07	0,53-0,65 (0,58) ±0,04	0,51-0,68 (0,58) ±0,02	***[a]0,002***
Sağ Epididimis Ağırlığı	*Min-Mak (Ort) ±Ss*	0,603-0,961 (0,78) ±0,049	0,56-0,66 (0,60) ±0,047	0,511-0,641 (0,573) ±0,018	***[a]0,000****

[a]One-Way ANOVA ***p<0,01* ****p<0,001*

Sıçanların başlangıç ağırlıkları ortalamaları kontrol grubunda 323,50±15,93 gram (g), BEP grubunda 328,13±13,33 g, BEP+GSH grubunda 338,13±11,91 g olup; deneylerin sonunda yapılan ölçümde bitiş ağırlıkları ortalamaları kontrol grubunda 398,00±17,08 gram (g), BEP grubunda 374,50±11,75 g, BEP+GSH grubunda 380,63±12,80 g saptandı (Tablo 8).

Kontrol, BEP ve BEP+GSH grupları arasında yapılan karşılaştırmada başlangıç ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.749; p>0,05). Yine üç grup bitiş ağırlıkları açısından karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.484; p>0,05).

Ağırlık artışları ortalamaları kontrol grubunda 74,50±10,55 g, BEP grubunda 46,38±5,58 g, BEP+GSH grubunda 49,07±2,78 g olup; testis ağırlık indeksleri ortalamaları kontrol grubunda 0,94±0,026, BEP grubunda 0,81±0,045, BEP+GSH grubunda 0,76±0,019 olarak bulundu (Tablo 8).

Tablo 9. Ağırlık artışları gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	**Deney Grubu (J)**	**Ortalama fark (I-J)**	**Std. hata**	**95%'lik güvenirlik aralığı**		***p* değeri**
				Alt sınır	**Üst sınır**	
Kontrol	BEP	28,125	10,006	2,90	53,35	***0,027****
	BEP+GSH	32,000	10,006	6,78	57,22	***0,012****
BEP	BEP+GSH	3,875	10,006	-21,35	29,10	*0,921*
	Kontrol	-28,125	10,006	-53,35	-2,90	***0,027****
BEP+GSH	BEP	-3,875	10,006	-29,10	21,35	*0,921*
	Kontrol	-32,000	10,006	-57,22	-6,78	***0,012****

Tukey HSD **p<0,05*

Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada ağırlık artışları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,008; p<0,05). Tablo 9'da kontrol grubundaki ağırlık artışı BEP grubu ve BEP+GSH grubundan yüksek bulundu (sırasıyla p=0,027, p=0,012; p<0,05), BEP grubu ile BEP+GSH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,921; p>0,05).

Tablo 10. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	Deney Grubu (J)	Ortalama fark (I-J)	Std. hata	95%'lik güvenirlik aralığı		*p değeri*
				Alt sınır	Üst sınır	
Kontrol	BEP	0,135375	0,044732	0,02262	0,24813	***0,017****
	BEP+GSH	0,182500	0,044732	0,06975	0,29525	***0,001****
BEP	BEP+GSH	0,047125	0,044732	-0,06563	0,15988	*0,552*
	Kontrol	-0,135375	0,044732	-0,24813	-0,02262	***0,017****
BEP+GSH	BEP	-0,047125	0,044732	-0,15988	0,06563	*0,552*
	Kontrol	-0,182500	0,044732	-0,29525	-0,06975	***0,001****

Tukey HSD **p<0,05* ***p<0,01*

Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada testis ağırlık indeksleri (TAİ) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0, 002; p<0,05). Tablo 10'da gösterildiği gibi kontrol grubunun testis ağırlık indeksleri BEP grubu ve BEP+GSH grubundan yüksek bulundu (sırasıyla p=0,017, p=0,001; p<0,05). BEP grubu ile BEP+GSH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,552; p>0,05).

Tablo 8'de gösterildiği gibi sol testis ağırlıkları ortalamaları kontrol grubunda 1,87±0,057 g, BEP grubunda 1,64±0,10 g, BEP+GSH grubunda 1,47±0,058 g; sağ testis ağırlığı ortalamaları kontrol grubunda 1,86±0,06 g, BEP grubunda 1,58±0,14 g, BEP+GSH grubunda 1,41±0,05 g olarak bulundu.

Tablo 11. Sol testis ağırlıkları gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	Deney Grubu (J)	Ortalama fark (I-J)	Std. hata	95%'lik güvenirlik aralığı		*p değeri*
				Alt sınır	Üst sınır	
Kontrol	BEP	0,22889	0,08079	0,025	0,433	***0,027****
	BEP+GSH	0,39725	0,07805	0,200	0,595	***0,000****
BEP	BEP+GSH	0,16836	0,08079	-0,036	0,373	*0,119*
	Kontrol	-0,22889	0,08079	-0,433	-0,025	***0,027****
BEP+GSH	BEP	-0,16836	0,08079	-0,373	0,036	*0,119*
	Kontrol	-0,39725	0,07805	-0,595	-0,200	***0,000****

Tukey HSD **p<0,05* ****p<0,001*

Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada sol testis ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,000; p<0,05). Tablo 11'de kontrol grubunun sol testis

ağırlıkları, BEP grubu ve BEP+GSH grubundan yüksek bulundu (sırasıyla p=0,027, p=0,000; p<0,05). BEP grubu ile BEP+GSH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,119; p>0,05).



Şekil 20. BEP grubundaki 8 no'lu sıçanın sağ ve sol testis boyutu farkı

Tablo 12. Sağ testis ağırlıkları gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	**Deney Grubu (J)**	**Ortalama fark (I-J)**	**Std. hata**	**95%'lik güvenirlik aralığı**		***p değeri***
				Alt sınır	**Üst sınır**	
Kontrol	BEP	0,27946	0,06834	-0,02309	0,86009	***0,002****
	BEP+GSH	0,44563	0,06602	0,24031	0,65094	***0,000******
BEP	BEP+GSH	0,16616	0,06834	-0,41263	0,46688	*0,061*
	Kontrol	-0,27946	0,06834	-0,86009	0,02309	***0,002****
BEP+GSH	BEP	-0,16616	0,06834	-0,46688	0,41263	*0,061*
	Kontrol	-0,44563	0,06602	-0,65094	-0,24031	***0,000******

Tukey HSD **p<0,05* ***p<0,01* ****p<0,001*

Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada sağ testis ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0.000; p<0,001). Tablo 12'de gösterildiği gibi kontrol grubunun sağ testis ağırlıkları BEP grubu ve BEP+GSH

grubunun sağ testis ağırlıklarına göre yüksek bulundu (sırasıyla p=0,002, p=0,000; p<0,001). BEP grubu ile BEP+GSH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,061; p>0,05). Sıçanlardan ikisinde Şekil 20 ve Şekil 21'de görüldüğü gibi sağ ve sol testis boyutlarında farklılıklar saptandı.



Şekil 21. BEP grubundaki 3 no'lu sıçanın sağ ve sol testisindeki boyut farkı

Tablo 8'de görüldüğü gibi sol epididimis ağırlığı ortalamaları kontrol grubunda 0,81±0,07 g, BEP grubunda 0,58±0,04 g, BEP+GSH grubunda 0,58±0,02 g; sağ epididimis ağırlıkları ortalamaları kontrol grubunda 0,78±0,049 g, BEP grubunda 0,60±0,047 g, BEP+GSH grubunda 0,57±0,018 g olarak bulundu.

Tablo 13. Sol epididimis ağırlıkları gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	**Deney Grubu (J)**	**Ortalama fark (I-J)**	**Std. hata**	**95%'lik güvenirlik aralığı**		***p değeri***
				Alt sınır	**Üst sınır**	
Kontrol	BEP	0,20670	0,06327	0,02439	0,46136	***0,010****
	BEP+GSH	0,22525	0,06113	0,01424	0,43626	***0,004****
BEP	BEP+GSH	0,01855	0,06327	-0,14452	0,10927	*0,954*
	Kontrol	-0,20670	0,06327	-0,46136	-0,02439	***0,010****
BEP+GSH	BEP	-0,01855	0,06327	-0,10927	0,14452	*0,954*
	Kontrol	-0,22525	0,06113	-0,43626	-0,01424	***0,004****

Tukey HSD ***p<0,01*

Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada sol epididimis ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,002; p<0,05). Tablo 13'te görüldüğü gibi kontrol grubunun sol epididimis ağırlıkları BEP grubunun ve BEP+GSH grubuna göre yüksek olup istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla p=0.010; p= 0,004; p<0,05), BEP grubu ile BEP+GSH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,954; p>0,05).

Tablo 14. Sağ epididimis ağırlıkları gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	**Deney Grubu (J)**	**Ortalama fark (I-J)**	**Std. hata**	**95%'lik güvenirlik aralığı**		***p değeri***
				Alt sınır	**Üst sınır**	
Kontrol	BEP	0,18230	0,04570	0,08411	0,37314	***0,002****
	BEP+GSH	0,21162	0,04415	0,06711	0,35614	***0,000*****
BEP	BEP+GSH	0,02932	0,04570	-0,16151	0,12751	*0,799*
	Kontrol	-0,18230	0,04570	-0,37314	-0,08411	***0,002****
BEP+GSH	BEP	-0,02932	0,04570	-0,12751	0,16151	*0,799*
	Kontrol	-0,21162	0,04415	-0,35614	-0,06711	***0,000*****

Tukey HSD ***p<0,01* ****p<0,001*

Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada sağ epididimis ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,000; p<0,001). Tablo 14'te görüldüğü gibi kontrol grubunun sağ epididimis ağırlığı BEP grubu ve BEP+GSH grubundan yüksek bulunup istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla p=0,002; p=0,000; p<0,05). BEP ve BEP+GSH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,799; p>0,05).

4.1.2 Sperm parametreleri, sperm DNA fragmantasyonu ve serum testosteron seviyesinin değerlendirilmesi

Tablo 15. Kontrol, BEP ve BEP+GSH gruplarında sperm parametreleri

		Kontrol	**BEP**	**BEP+GSH**	***p***
Sperm Sayısı	*Min-Mak*	340-600	90-130	180-350	***[a]0,000******
	(Ort)	(408,13)	(112,50)	(271,25)	
	±*Ss*	±29,61	±4,12	±21,83	
Morfolojik	*Min-Mak*	8,05-19,00	18,38-35,79	9,33-15,32	***[a]0,000******
Anomalili Sperm	*(Ort)*	(12,48)	(25,56)	(12,14)	
oranı	±*Ss*	±1,31	±2,27	±0,67	
Baş, Çekirdek,	*Min-Mak*	7-1 (4,38)	12-22 (16,00)	6-10 (8,13)	***[a]0,000******
Kromozom	*(Ort)*				
Anomalili Sperm	±*Ss*	±0,71	±1,18	±0,52	
Sayısı					
Boyun, Kuyruk	*Min-Mak*	15-21 (18,00)	25-57 (38,25)	12-21 (17,25)	***[a]0,000******
Anomalili Sperm	*(Ort)*				
Sayısı	±*Ss*	±0,73	±4,03	±1,16	
Çoklu Anomalili	*Min-Mak*	0-2 (0,63)	0-6 (2,00)	0-5 (1,63)	*[b]0,206*
Sperm Sayısı	*(Medyan)*				
	±*Ss*	±0,26	±0,73	±0,53	
Sperm DNA	*Min-Mak*	1,79-15,69	23,19-64,60	7,94-32,00	***[a]0,000******
Fragmantasyonu	*(Ort)*	(6,78)	(38,41)	(16,86)	
Oranı	±*Ss*	±1,64	±4,83	±2,67	
Serum Testosteron	*Min-Mak*	516-739	20-61 (36,13)	71-589	***[a]0,000******
Seviyesi	*(Ort)*	(598,13)		(304,63)	
	±*Ss*	±30,49	±4,81	±71,40	

[a]One-Way ANOVA *[b]Kruskal Wallis* **** p<0,001*

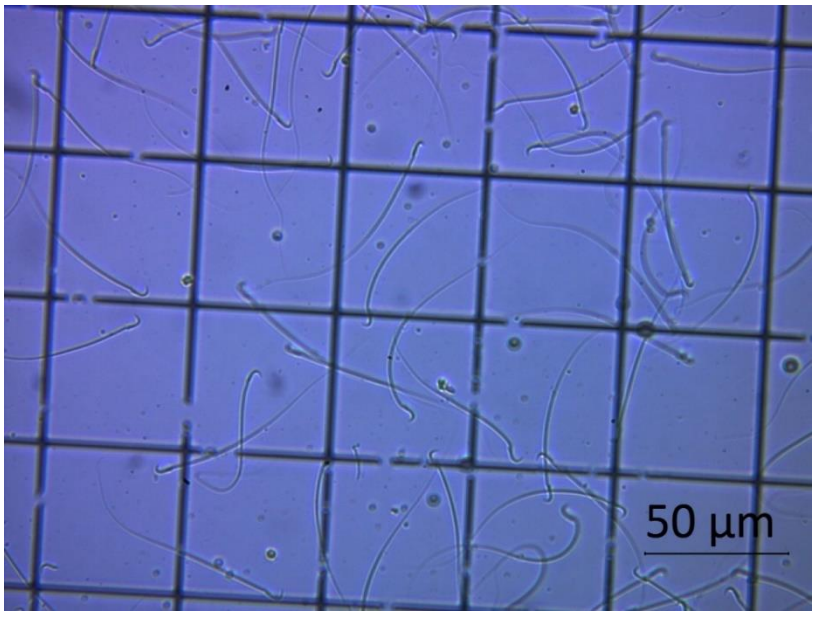
Tablo 15'te gösterildiği gibi ml deki sperm sayıları ortalamaları kontrol grubunda 408,13±29,61x10^6, BEP grubunda 112,50±4,12x10^6, BEP+GSH grubunda 271,25±21,83x10^6 olarak bulundu.

Tablo 16. Sperm sayısı gruplar arası karşılaştırma

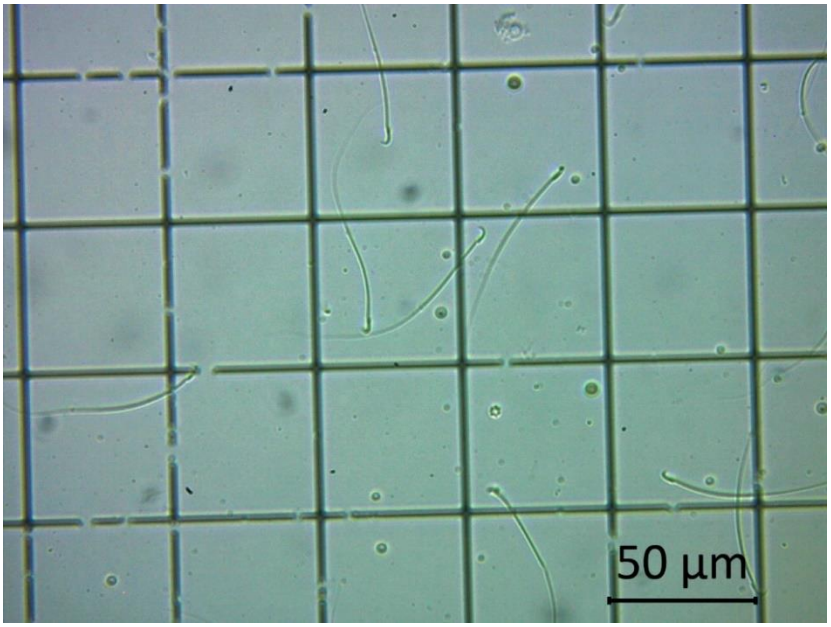
Deney Grubu (I)	Deney Grubu (J)	Ortalama fark (I-J)	Std. hata	95%'lik güvenirlik aralığı		*p değeri*
				Alt sınır	Üst sınır	
Kontrol	BEP	295,625	30,224	219,44	371,81	***0,000****
	BEP+GSH	136,875	30,224	60,69	213,06	***0,001****
BEP	BEP+GSH	-158,750	30,224	-234,93	-82,57	***0,000****
	Kontrol	-295,625	30,224	-371,81	-219,44	***0,000****
BEP+GSH	BEP	158,750	30,224	82,57	234,93	***0,000****
	Kontrol	-136,875	30,224	-213,06	-60,69	***0,001****

Tukey HSD ****p<0,001*

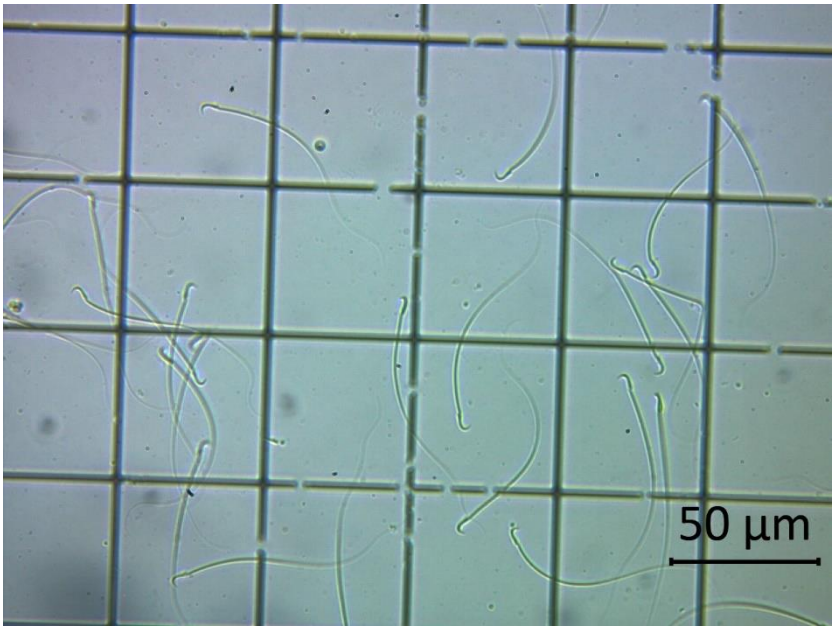
Tedavi grupları arasında yapılan karşılaştırmada ml deki sperm sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,000; p<0,001). Tablo 16'da görüldüğü gibi BEP+GSH grubunun sperm sayısı BEP grubundan yüksek olup istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0,001; p<0,01). Şekil 22, Şekil 23 ve Şekil 24'te görüldüğü gibi Kontrol grubunun ml'deki sperm sayısı en yüksek olup BEP ve BEP+GSH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla p=0.000; p=0,001; p<0,001).



Şekil 22. Kontrol grubu Makler sperm sayımı (20X)



Şekil 23. BEP grubu Makler sperm sayımı (20X)



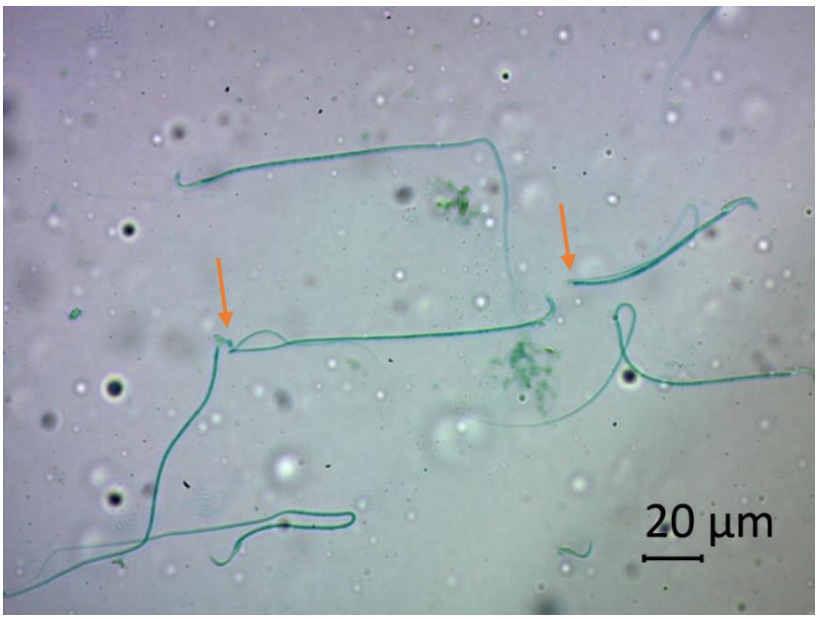
Şekil 24. BEP+GSH grubu Makler sperm sayımı (20X)

Tablo 17. Morfolojik anomali oranı gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	Deney Grubu (J)	Ortalama fark (I-J)	Std. hata	95%'lik güvenirlik aralığı		*p değeri*
				Alt sınır	Üst sınır	
Kontrol	BEP	-13,09125*	2,20739	-18,6551	-7,5274	***0,000******
	BEP+GSH	0,33000	2,20739	-5,2339	5,8939	*0,988*
BEP	BEP+GSH	13,42125*	2,20739	7,8574	18,9851	***0,000******
	Kontrol	13,09125*	2,20739	7,5274	18,6551	***0,000******
BEP+GSH	BEP	-13,42125*	2,20739	-18,9851	-7,8574	***0,000******
	Kontrol	-0,33000	2,20739	-5,8939	5,2339	*0,988*

Tukey HSD ****p<0,001*

Tedavi grupları arasında yapılan karşılaştırmada morfolojik anomali oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,000; p<0,001). Tablo 17'de görüldüğü gibi BEP+GSH grubunun morfolojik anomali oranları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,988; p>0,05). BEP grubunun morfolojik anomali oranı kontrol grubu ve BEP+GSH grubuna göre yüksek bulunup istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla p=0,000; p=0,000; p<0,001).

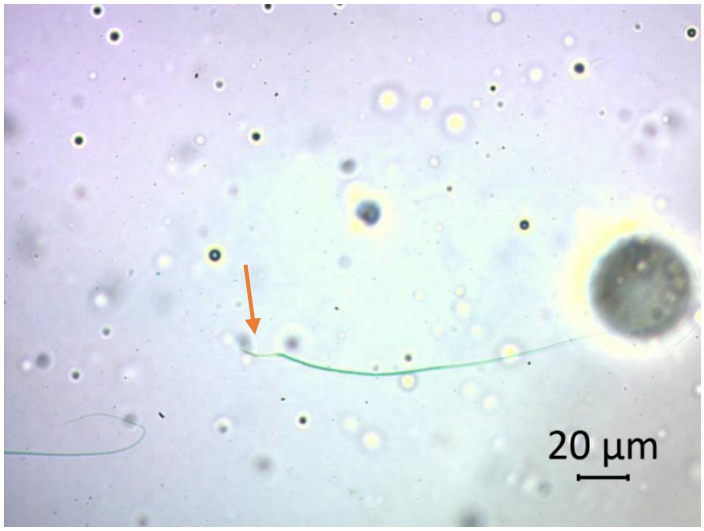


Şekil 25. BEP grubu kırık kuyruk morfolojisi (Turuncu oklar) (Spermac boyaması, 40X)

Tablo 15'te gösterildiği gibi baş-çekirdek ve kromozom anomalisi olan sperm sayıları ortalaması kontrol grubunda 4,38±0,71, BEP grubunda 16±2,27, BEP+GSH grubunda 8,13±0,67 olarak bulundu.

Tablo 18. Baş, çekirdek ve kromozom anomalisi gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	**Deney Grubu (J)**	**Ortalama fark (I-J)**	**Std. hata**	**95%'lik güvenirlik aralığı**		***p değeri***
				Alt sınır	**Üst sınır**	
Kontrol	BEP	-11,625*	1,199	-14,65	-8,60	***0,000******
	BEP+GSH	-3,750*	1,199	-6,77	-0,73	***0,014****
BEP	BEP+GSH	7,875*	1,199	4,85	10,90	***0,000******
	Kontrol	11,625*	1,199	8,60	14,65	***0,000******
BEP+GSH	BEP	-7,875*	1,199	-10,90	-4,85	***0,000******
	Kontrol	3,750*	1,199	0,73	6,77	***0,014****
Tukey HSD	**p<0,05*	****p<0,001*				



Şekil 26. BEP grubu yassılaşmış kafa morfolojisi (Spermac boyama, 40X)

Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada Şekil 26'da görüldüğü gibi baş-çekirdek ve kromozom anomalisi olan sperm sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,000; p<0,001). Tablo 18'de görüldüğü gibi BEP+GSH grubunun baş-çekirdek ve kromozom anomalisi olan sperm sayısı BEP grubuna göre düşük bulunup istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0,000; p<0,001). BEP grubunda baş-çekirdek

ve kromozom anomalisi olan sperm sayısı, kontrol grubu ve BEP+GSH grubuna göre yüksek olup istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur(p=0,000; p<0,001; p=0,000; p<0,001). Kontrol grubunun baş-çekirdek ve kromozom anomalisi olan sperm sayısı BEP+GSH grubundan düşük olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0,014; p<0,05).

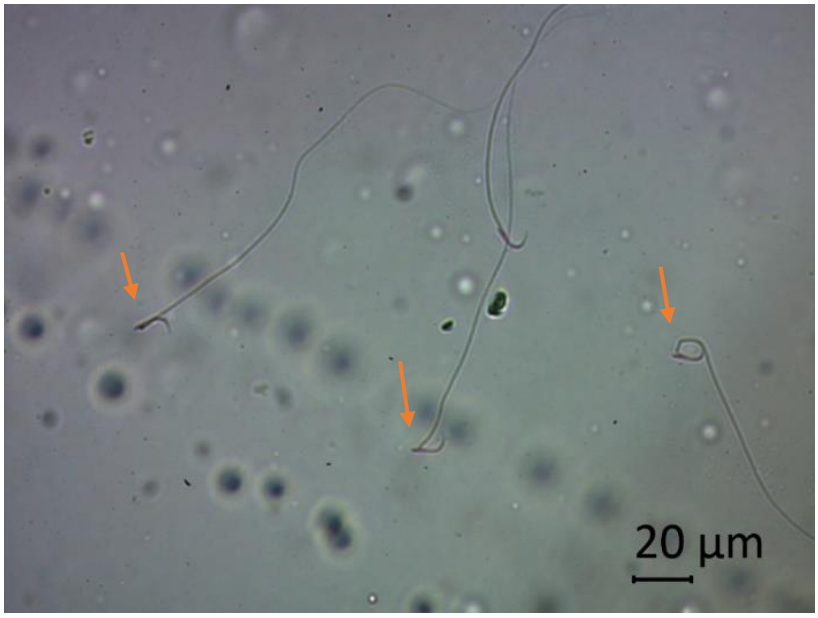
Tablo 15'te boyun-kuyruk anomalisi olan sperm sayıları ortalamaları kontrol grubunda 18±0,73, BEP grubunda 38,25±4,03, BEP+GSH grubunda 17,25±1,16 olarak bulundu.

Tablo 19. Boyun-kuyruk anomalisi gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	**Deney Grubu (J)**	**Ortalama fark (I-J)**	**Std. hata**	**95%'lik güvenirlik aralığı**		***p değeri***
				Alt sınır	**Üst sınır**	
Kontrol	BEP	-20,25	3,473	-29,00	-11,50	***0,000****
	BEP+GSH	0,75	3,473	-8,00	9,50	*0,975*
BEP	BEP+GSH	21,00	3,473	12,25	29,75	***0,000****
	Kontrol	20,25	3,473	11,50	29,00	***0,000****
BEP+GSH	BEP	-21,00	3,473	-29,75	-12,25	***0,000****
	Kontrol	-0,75	3,473	-9,50	8,00	*0,975*

Tukey HSD ****p<0,001*

Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada Şekil 27'de görüldüğü gibi boyun-kuyruk anomalisi olan sperm sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,000; p<0,001). Tablo 19'da gösterildiği gibi BEP+GSH grubunda ve kontrol grubunda boyun-kuyruk anomalisi olan sperm sayısı BEP grubuna göre düşük bulunup istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla p=0,000; p=0,000; p<0,001). Kontrol grubu ile BEP+GSH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,975; p>0,05).



Şekil 27. BEP grubu kırık boyun morfolojisi (Turuncu oklar) (Spermac boyama, 40X)

Tablo 15'te görüldüğü gibi çoklu anomalisi olan sperm sayısı medyan değerleri kontrol grubunda 0,63±0,26, BEP grubunda 2,0±0,73, BEP+GSH grubunda 1,63±0,53 olarak bulundu.

Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada çoklu anomalisi olan sperm sayıları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.206; p>0,05).



Şekil 28. Çoklu anomali (kırık boyun+kırık kuyruk) morfolojisi (Spermac boyama, 40X)

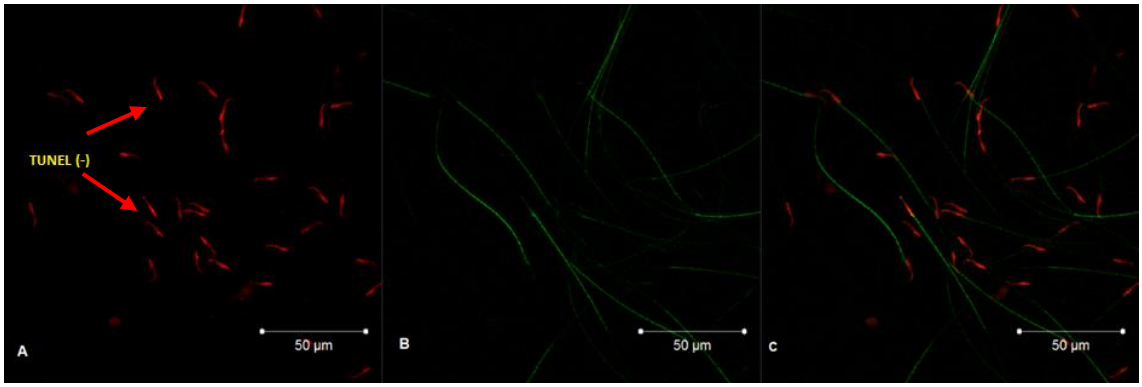
Tablo 15'te görüldüğü gibi sperm DNA fragmantasyon oranı ortalamaları kontrol grubunda %6,78±1,64, BEP grubunda %38,41±4,83, BEP+GSH grubunda %16,86±2,67 olarak bulundu.

Tablo 20. Sperm DNA fragmantasyonu gruplar arası karşılaştırma

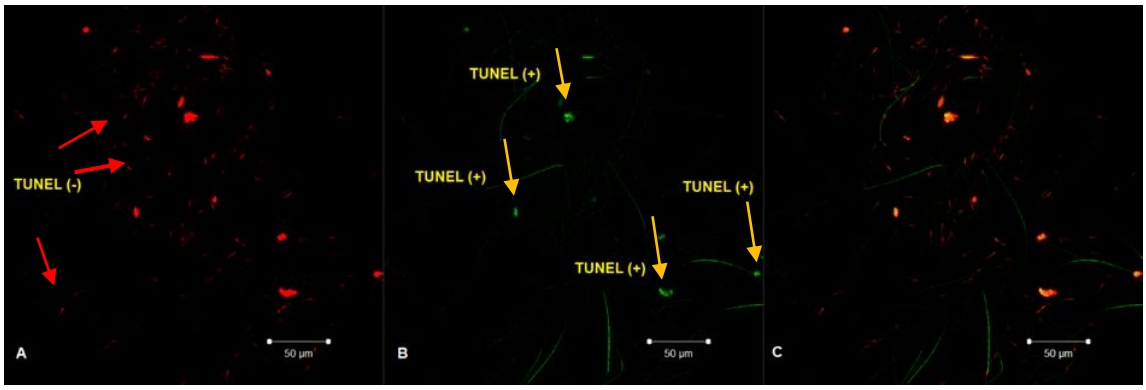
Deney Grubu (I)	**Deney Grubu (J)**	**Ortalama fark (I-J)**	**Std. hata**	**95%'lik güvenirlik aralığı**		***p değeri***
				Alt sınır	**Üst sınır**	
Kontrol	BEP	-31,6325	4,704892	-43,49151	-19,77349	***0,000******
	BEP+GSH	-10,0875	4,704892	-21,94651	1,77151	*0,105*
BEP	BEP+GSH	21,5450	4,704892	9,68599	33,40401	***0,000******
	Kontrol	31,6325	4,704892	19,77349	43,49151	***0,000******
BEP+GSH	BEP	-21,5450	4,704892	-33,40401	-9,68599	***0,000******
	Kontrol	10,0875	4,704892	-1,77151	21,94651	*0,105*

Tukey HSD ****p<0,001*

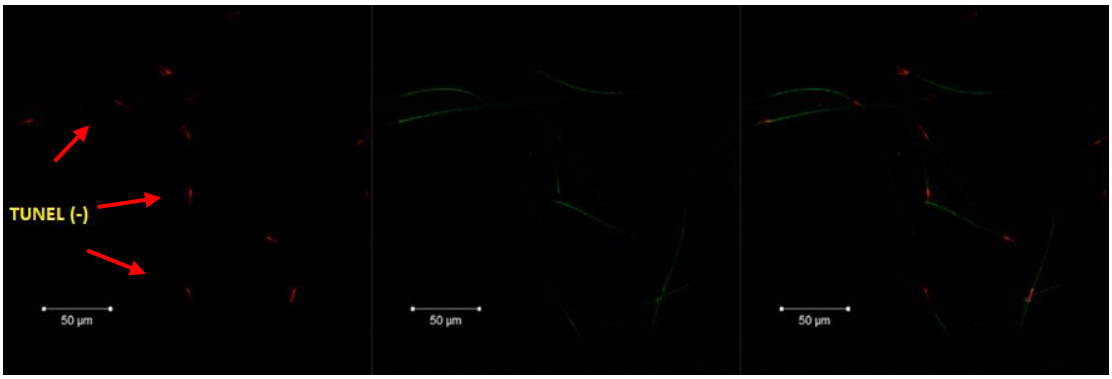
Tedavi grupları arasında yapılan karşılaştırmada sperm DNA fragmantasyonu oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,000; p<0,001). Tablo 20'de gösterildiği gibi BEP+GSH grubu ve kontrol grubunun sperm DNA fragmantasyonu Şekil 29 ve Şekil 30' da görüldüğü gibi BEP grubuna düşük olup istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla p=0,000; p=0,000; p<0,001). Şekil 29 ve Şekil 31'de görüldüğü gibi kontrol grubu ile BEP+GSH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,105; p>0,05).



Şekil 29. Kontrol grubu sperm kon-fokal mikroskop görüntüsü; DNA PI boyama (A) TUNEL (-) (kırmızı oklar), FITC boyama (B), PI+FITC boyama (C) (20X)



Şekil 30. BEP grubu sperm kon-fokal mikroskop görüntüsü; DNA PI boyama (A) TUNEL (-) (kırmızı oklar), FITC boyama (B) TUNEL (+) (sarı oklar), PI+FITC boyama (C) (20X)



Şekil 31. BEP+GSH grubu sperm kon-fokal mikroskop görüntüsü; DNA PI boyama (A) TUNEL (-) (kırmızı oklar), FITC boyama (B), PI+FITC boyama (C) (20X)

Tablo 21. Serum testosteron seviyesi gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	**Deney Grubu (J)**	**Ortalama fark (I-J)**	**Std. hata**	**95%'lik güvenirlik aralığı**		***p değeri***
				Alt sınır	**Üst sınır**	
Kontrol	BEP	562,0	63,511	401,92	722,08	***0,000******
	BEP+GSH	293,5	63,511	133,42	453,58	***0,000******
BEP	BEP+GSH	-268,5	63,511	-428,58	-108,42	***0,001******
	Kontrol	-562,0	63,511	-722,08	-401,92	***0,000******
BEP+GSH	BEP	268,5	63,511	108,42	428,58	***0,001******
	Kontrol	-293,5	63,511	-453,58	-133,42	***0,000******

Tukey HSD ****p<0,001*

Tedavi grupları arasında yapılan karşılaştırmada serum testosteron seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,000; p<0,001). Tablo 21'de gösterildiği gibi kontrol grubunun testosteron seviyesi BEP ve BEP+GSH gruplarından yüksek olup (sırasıyla p=0,000; p=0,000; p<0,001), BEP+GSH grubunun testosteron seviyesi de BEP grubundan yüksek bulundu (p=0,001; p<0,01).

4.1.3 Testis histopatolojisinin değerlendirilmesi

Tablo 22. Kontrol, BEP ve BEP+GSH gruplarında testislerin histolojik değerlendirmesi

		Kontrol	**BEP**	**BEP+GSH**	***p değeri***
Seminifer Tübül Epitel Kalınlığı	*Min-Mak (Ort) ±Ss*	90,94-138,01 (112,15) ±6,43	50,12-61,69 (53,18) ±1,29	81,34-109,90 (97,91) ±3,29	***[a]0,000******
Johnsen Skorlaması	*Min-Mak (Ort) ±Ss*	10-10 (10,00) ±0,00	6-7 (6,88) ±0,13	9-10 (9,75) ±0,16	***[a]0,000******

[a]One-Way ANOVA **** p<0,001*

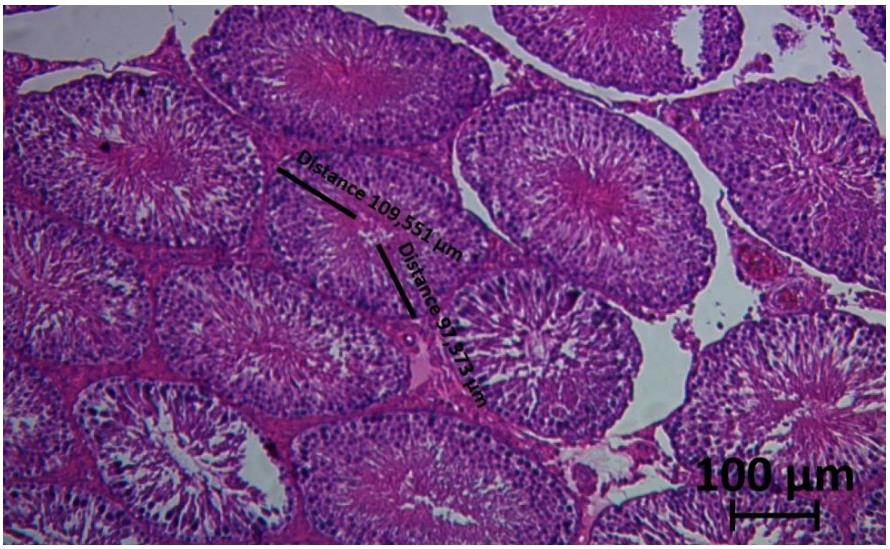
Seminifer tübül epiteli kalınlığı ortalamaları Tablo 22'de görüldüğü gibi kontrol grubunda 112,15±6,43 μm, BEP grubunda 53,18±1,29 μm, BEP+GSH grubunda 97,91±3,29 μm olarak bulundu.

Tablo 23. Seminifer tübül epitel kalınlıkları gruplar arası karşılaştırma

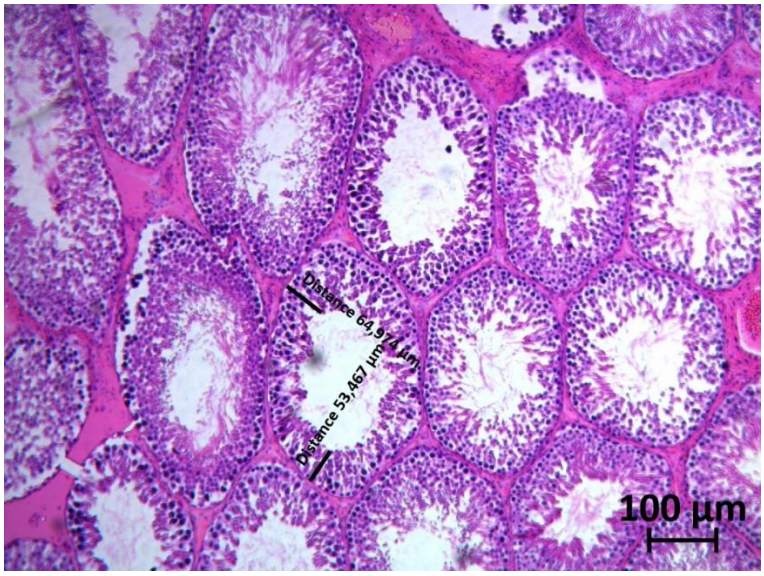
Deney Grubu (I)	**Deney Grubu (J)**	**Ortalama fark (I-J)**	**Std. hata**	**95%'lik güvenirlik aralığı**		**p değeri**
				Alt sınır	**Üst sınır**	
Kontrol	BEP	58,971125	5,991060	43,87024	74,07201	***0,000******
	BEP+GSH	14,244000	5,991060	-,85689	29,34489	*0,067*
BEP	BEP+GSH	-44,72712	5,991060	-59,82801	-29,62624	***0,000******
	Kontrol	-58,97112	5,991060	-74,07201	-43,87024	***0,000******
BEP+GSH	BEP	44,727125	5,991060	29,62624	59,82801	***0,000******
	Kontrol	-14,244000	5,991060	-29,34489	0,85689	*0,067*

Tukey HSD ****p<0,001*

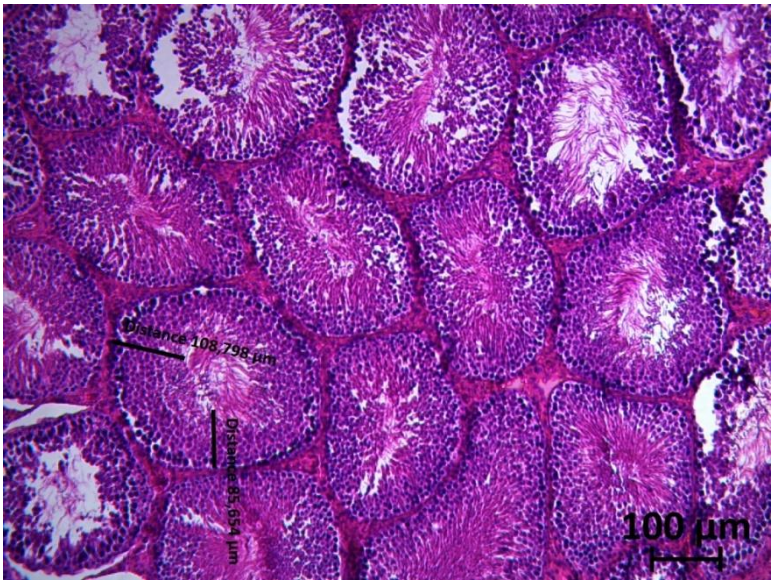
Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada seminifer tübül epiteli kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,000; p<0,001). Tablo 23'te görüldüğü gibi BEP+GSH grubu ve kontrol grubunun seminifer tübül epiteli kalınlıkları BEP grubundan yüksek bulunup istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla p=0.000; p=0.000; p<0,001). Kontrol grubu ile BEP+GSH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,067; p>0,05).



Şekil 32. Kontrol grubu testis histogram (H&E Boyama, 10X)



Şekil 33. BEP grubu testis histogram (H&E boyama, 10X)



Şekil 34. BEP+GSH grubu testis histogram (H&E boyama, 10X)

Tablo 22'de Johnsen skorlaması ortalamaları kontrol grubunda 10±0, BEP grubunda 6,78±0,13, BEP+GSH grubunda 9,75±0,16 olarak bulundu.

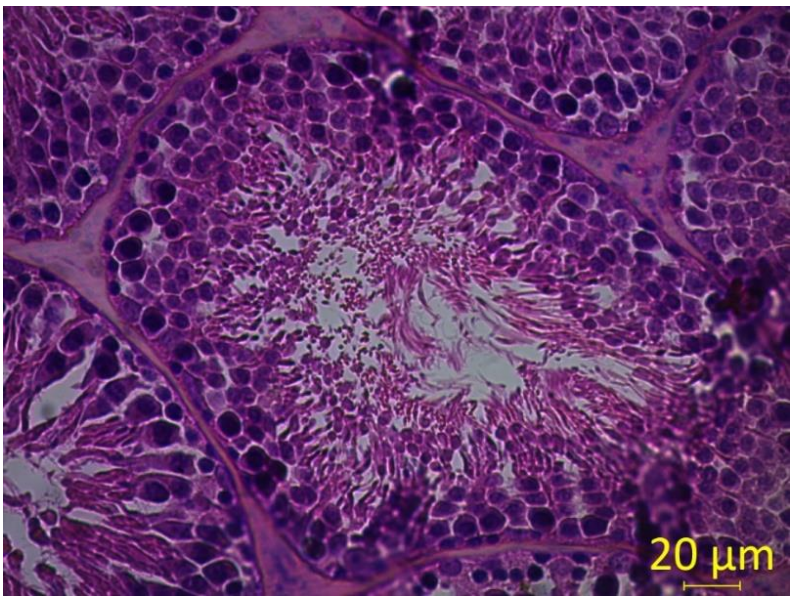
Tablo 24. Johnsen skorlaması gruplar arası karşılaştırma

Deney Grubu (I)	**Deney Grubu (J)**	**Ortalama fark (I-J)**	**Std. hata**	**95%'lik güvenirlik aralığı**		***p değeri***
				Alt sınır	**Üst sınır**	
Kontrol	BEP	3,125	0,168	2,70	3,55	***0,000******
	BEP+GSH	0,250	0,168	-,17	0,67	*0,317*
BEP	BEP+GSH	-2,875	0,168	-3,30	-2,45	***0,000******
	Kontrol	-3,125*	0,168	-3,55	-2,70	***0,000******
BEP+GSH	BEP	2,875	0,168	2,45	3,30	***0,000******
	Kontrol	-0,250	0,168	-,67	0,17	*0,317*

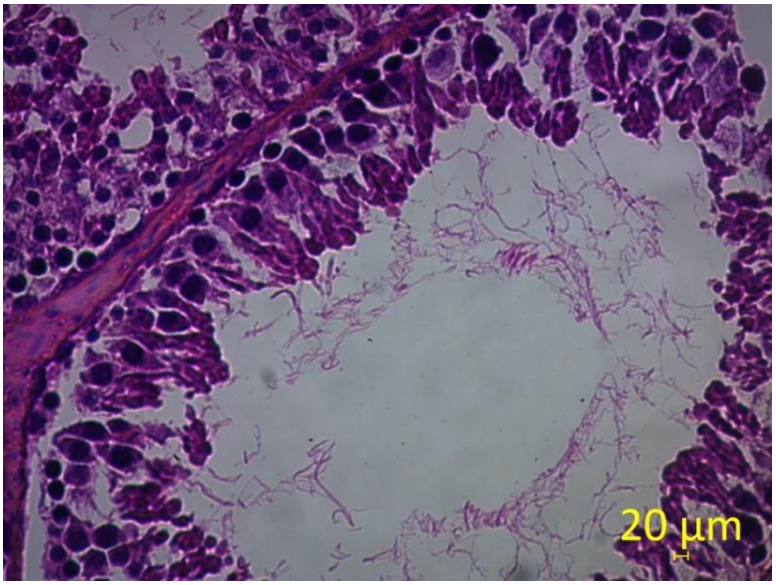
Tukey HSD ****p<0,001*

Üç grup arasında yapılan karşılaştırmada Johnsen skorlamasıyla testislerin histopatolojik değerlendirmesi yapıldı grupların Jonhsen skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0,000; p<0,001). Tablo 24'te görüldüğü gibi testislerin histopatolojisi değerlendirildiğinde, BEP+GSH ve kontrol grubu değerlerinin Johnsen BEP grubundan yüksek bulunduğu görülüp istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (sırasıyla p=0,000; p=0,000; p<0,001). Şekil 35 ve Şekil 37'de görüldüğü gibi kontrol

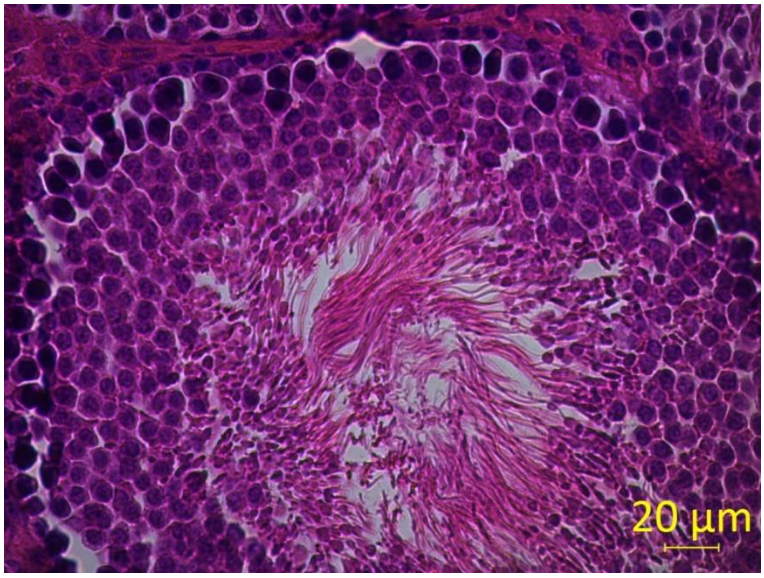
grubu ile BEP+GSH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,317; p>0,05). Şekil 36'da da görüldüğü gibi BEP grubunda Johnsen skoru düşük bulundu.



Şekil 35. Kontrol grubu seminifer tübül histogram (H&E boyama, 40X)



Şekil 36. BEP grubu seminifer tübül histogram (H&E boyama, 40X)

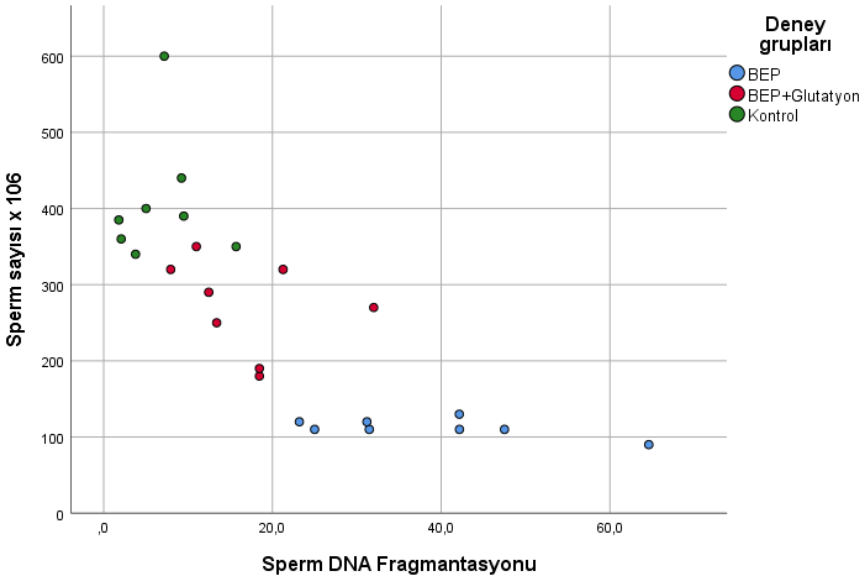


Şekil 37. BEP+GSH grubu seminifer tübül histogram (H&E boyama, 40X)

Tablo 25. Serum testosteron seviyesi, sperm parametreleri ve testis histopatolojisinin sperm DNA fragmantasyonu ile ilişkisi

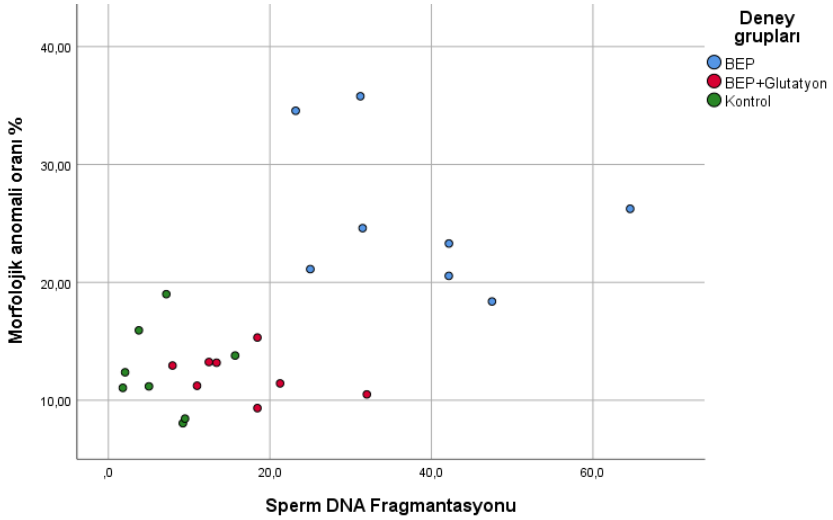
	Sperm DNA Fragmantasyonu Oranları	
	r	***p***
Sperm sayısı	-0,773	***0,000****
Morfolojik Anomalili Sperm Oranı	0,562	***0,004****
Serum Testosteron Seviyesi	-0,682	***0,000****
Seminifer Tübül Epitel Kalınlığı	-0,782	***0,000****
Johnsen Skorlaması	-0,787	***0,000****
r: Pearson Korelasyon Katsayısı	***p<0,01*	****p<0,001*

Tablo **25**'te görüldüğü gibi sperm DNA Fragmantasyonu oranları ile sperm sayısı arasında negatif yönlü (sperm DNA fragmantasyonu arttıkça sperm sayısı azalan) %77,3 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (r: -0,773; p=0,004; p<0,01) (Şekil 38).



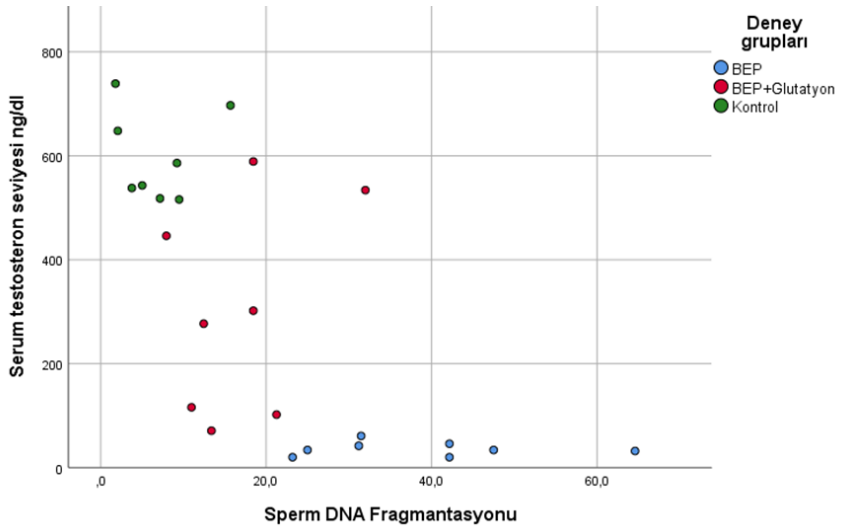
Şekil 38. Sperm DNA fragmantasyonu sperm sayısı ilişkisi

Tablo **25**' te sperm DNA Fragmantasyonu oranları ile morfolojik anomalili sperm oranı arasında pozitif yönlü (Sperm DNA Fragmantasyonu arttıkça morfolojik anomalili sperm oranı artan) %56,2 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (r:0,562; p=0,000; p<0,001) (Şekil 39).



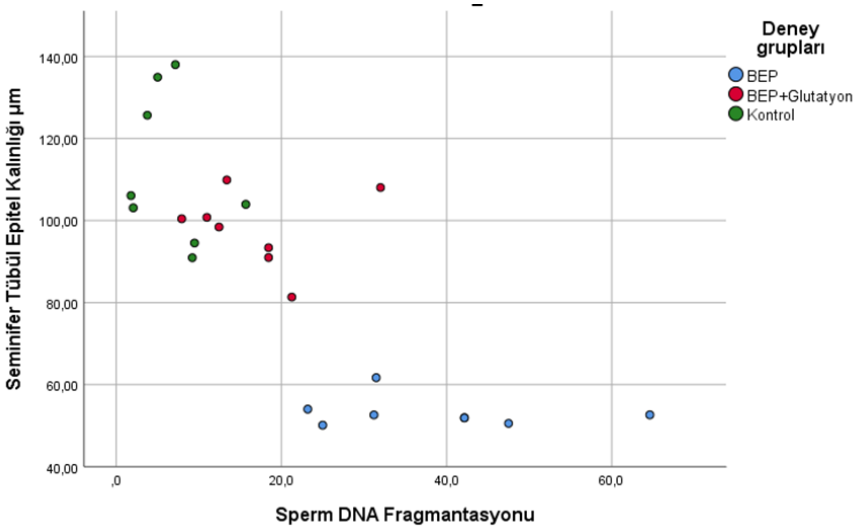
Şekil 39. Sperm DNA fragmantasyonu morfolojik anomalili sperm oranı ilişkisi

Tablo **25**'te sperm DNA Fragmantasyonu oranları ile serum testosteron seviyesi arasında negatif yönlü (Sperm DNA Fragmantasyonu arttıkça serum testosteron seviyesi azalan) %68,2 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (r: -0,682; p=0,000; p<0,001) (Şekil 40).



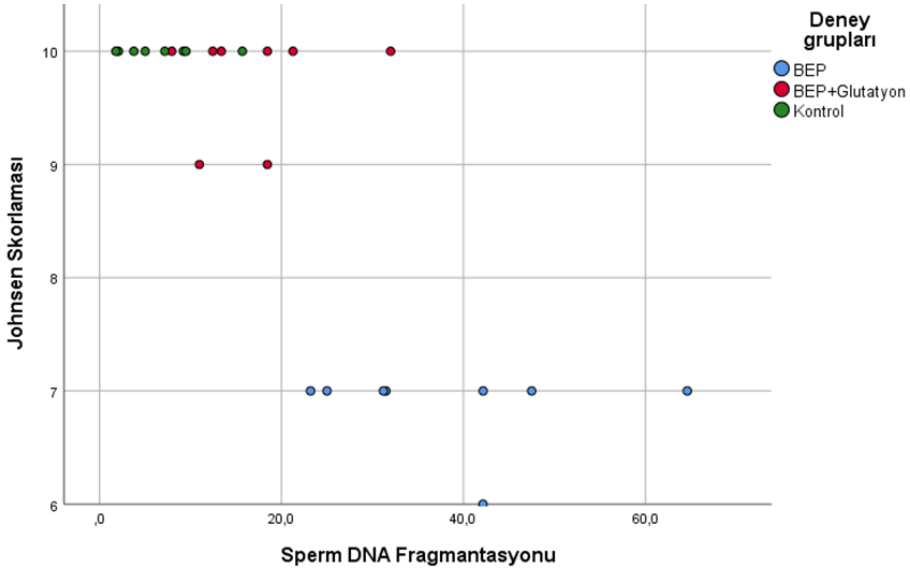
Şekil 40. Sperm DNA fragmantasyonu serum testosteron seviyesi ilişkisi

Tablo **25**' te sperm DNA Fragmantasyonu oranları ile seminifer tübül epitel kalınlığı arasında negatif yönlü (Sperm DNA Fragmantasyonu arttıkça seminifer tübül epitel kalınlığı azalan) %78,2 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (r: -0,782; p=0,000; p<0,001) (Şekil 41).



Şekil 41. Sperm DNA Fragmantasyonu Seminifer Tübül Epitel Kalınlığı İlişkisi

Tablo **25**' te sperm DNA Fragmantasyonu oranları ile Johnsen skorlaması arasında negatif yönlü (Sperm DNA Fragmantasyonu arttıkça Johnsen skorlaması azalan) %78,7 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (r: -0,787; p=0,000; p<0,001) (Şekil 42).



Şekil 42. Sperm DNA fragmantasyonu johnsen skorlaması ilişkisi

4.2 Tartışma

Üreme çağındaki erkeklerde testis kanseri prevalansı yüksek olmasına karşın erken teşhis ve tedaviler ile hastaların % 95 sağ kalım oranı olduğu gösterilmiştir (Kopp vd., 2006; Schagen vd., 2008).Tümörün histolojik yapısına göre farklı tedavi protokolleri uygulanmakla birlikte testis kanserinde en iyi tedavi yöntemi BEP tedavi protokolü olarak bildirilmiştir (Einhorn ve Foster, 2006; Schmoll vd., 2004). BEP tedavi protokolünün testis kanserinin tedavi edilmesinde en iyi yöntem olarak bildirilmekle birlikte üreme sistemi üzerinde geçici ve kalıcı hasarlar oluşturduğu gösterilmiştir. Üreme fonksiyonlarını bozduğu ve geçici ya da kalıcı infertiliteye sebep olabildiği bildirilmiştir. Yapılan hayvan deneyi çalışmalarında üreme organı ağırlıklarında, sperm sayısında, hareketliliğinde ve spermin kuyruk yapısında hasar oluşturduğu saptanmıştır (Bieber vd., 2006). BEP tedavisi uygulanan hastalarda tedavisi esnasında kilo kaybı ve kilo alamama durumları gözlenmiştir (Peckham vd., 1983). Sperm konsantrasyonlarının tedavi almayan gruba göre düşük bulunduğu, FSH seviyesinin BEP tedavisi almayan gruba göre yüksek olduğu, sperm DNA hasarının da BEP tedavisine bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir (O'Flaherty, Hales, Chan ve Robaire, 2010). Çalışmamızda da sperm sayısı kontrol grubunda BEP ve BEP+GSH grubunda anlamlı derecede yüksek bulunup ($p<0,001$; $p<0,0001$), BEP+GSH grubunda da BEP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.0001$). BEP tedavisinden sonra yüksek sperm anöploidi riski sebebiyle gebeliğin 24 ay veya daha fazla ertelenmesi gerekliliği bildirilmiştir (Rives vd., 2017).

Çalışmamızda erkek sıçanlara BEP tedavisi 9 hafta boyunca uygulandı ve sonuçları incelendi. Yapılan çalışmalarla paralel sonuçlar elde edilip, BEP ve BEP+GSH uygulanan gruplarda vücut ağırlık artışlarının kontrol grubuna göre daha az olduğu, Bieber ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi kontrol grubu ile BEP ve BEP+GSH grubunda testis ve epididim ağırlıkları arasında belirgin farklar olduğu görüldü. TAİ değerleri kontrol grubunda BEP grubuna ve BEP+GSH grubuna göre yüksek bulundu. Şahintürk ve arkadaşlarının etan dimetan sülfat (EDS) ile muamele edilen sıçanlarda E vitamininin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında E vitamini alan deneklerin TAİ değerlerinin ve testis ağırlıklarının korunduğu bildirilmiştir. BEP tedavisi aynı zamanda sistemik etki olarak Peckham ve arkadaşlarının insanlar üzerinde yaptıkları çalışmada

olduğu gibi kilo kaybına neden olmasa da; Moradi ve arkadaşlarının 2021 yılındaki çalışmasında olduğu gibi BEP ve BEP+GSH tedavisi alan gruplarda vücut ağırlık artışlarının kontrol grubuna göre daha az olduğu bulundu. Bununla birlikte ml deki sperm sayısı, serum testosteron seviyesi O'Flaherty ve arkadaşlarının çalışmasıyla benzer sonuçlar gösterdi (O'Flaherty vd., 2010). 2008 yılında Chen ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada testislerdeki glutatyon düzeyi butiyomin sülfoksimin (BSO) inkübasyonu ile %70 oranında azaltılmış ve buna bağlı olarak Leydig hücrelerinden elde edilen testosteron oranının %40 azaldığı görülmüştür (Chen vd., 2008). BEP tedavisi uygulanan grupta kontrol grubu ve BEP+GSH tedavisi uygulanan gruba göre ml'deki sperm sayısı ve serum testosteron seviyesi oldukça düşük bulunurken; morfolojik anomalisi olan sperm sayısı ve sperm DNA fragmantasyon oranları BEP tedavisi uygulanan grupta kontrol grubu ve BEP+GSH gruplarına göre yüksek bulundu. Maselli ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada BEP tedavi protokolünün sperm başı proteinlerinde olumsuz etkilerinin olduğu, olgun sperm DNA'sında denatürasyon ve iplik kopmalarına neden olduğu bildirilmiştir. Testis kanseri hastalarının hipotalamik-hipofiz gonal (HPGA) eksendeki bozulmaları, ateş ve yetersiz beslenme gibi kanser süreçleri ve sitotoksik kanser tedavilerinin fertiliteyi etkilediği görülmektedir. Spermatogenez hızlı hücre bölünmesinden dolayı radyoterapi ve kemoterapiye oldukça duyarlıdır (Ostrowski ve Walsh, 2015). Bizde çalışmamızda BEP tedavisi alan sıçanlarda sperm DNA fragmantasyonunun yüksek olduğunu TUNEL yöntemiyle gösterdik. BEP grubundaki sperm DNA fragmantasyon oranı kontrol grubuna göre ve BEP+GSH tedavisi uygulanan gruba göre belirgin şekilde yüksek bulundu, ancak kontrol grubu ve BEP+GSH tedavisi uygulanan grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü. BEP+GSH grubunda sperm DNA fragmantasyonu oranı kontrol grubundan yüksekti.

BEP tedavisinin sitotoksik özellik göstermekte olup testis histopatolojisini ve seminifer tübül epitel kalınlığını ve spermatogenezi etkilediği gösterilmiştir (Moradi vd., 2021). Çalışmamızda sol ve sağ testis ağırlıkları Moradi ve arkadaşlarının BEP'in toksik etkilerine karşı melatoninin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmasına benzer şekilde paralellik göstermiş olup kontrol grubunun, BEP grubu ve BEP+GSH gruplarına göre yüksek bulundu ancak BEP ve BEP+GSH grupları arasında Moradi ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak istatistiksel anlamlı bulunmadı. Epididimis ağırlıkları karşılaştırıldığında hem sağ hem de sol epididimis ağırlıkları kontrol grubunda diğer iki

gruba nazaran anlamlı ölçüde yüksek bulundu, BEP ve BEP+GSH grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Khadivi ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları BEP tedavisi esnasında çinkonun koruyucu etkinliğinin değerlendirildiği çalışmada da BEP tedavisi alan grupla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken BEP grubu ile BEP+Zn grubu arasında fark görülmüş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Grupların histopatolojik incelemeleri BEP tedavisi alan grupta seminifer tübül yapısında farklılaşmalar olduğunu gösterdi. Johnsen skorlaması yöntemiyle değerlendirildiğinde BEP tedavisi alan grupta seminifer tübül epitel kalınlığının belirgin şekilde inceldiği, seminifer tübül histolojik yapısının belirgin şekilde bozulduğu ve lümendeki sperm sayısının çok azaldığı görüldü. Benzer şekilde yapılan çalışmalarda seminifer tübül epitelinde germ hücrelerinde ve seminifer tübüllerin yapısında bozulmalar olduğu, lümendeki sperm sayılarının azaldığı gösterilmiştir (Khadivi vd., 2020; Moradi vd., 2021).

Oksidatif stres, organizmada homeostazisin sürdürülmesi için birbirini dengeleyen oksidan-antioksidan sistemin dengesinin bozulması nedeniyle oluşan bir süreçtir. Oksidatif stres artışı DNA, lipit, protein gibi biyomoleküllerin yapısında hasar oluşturmaktadır. Oksidatif stres nedeniyle DNA bütünlüğü bozulabilmekte ve mutasyonlara neden olabilmektedir. Sperm DNA'sı çok iyi paketlenmiş kromozom yapısına sahip olmasına karşın, SOR için substrat görevi gören bol miktarda çoklu doymamış yağ asidi içerdiğinden ve onarım mekanizmaları olmamasından kaynaklı olarak oksidatif hasara karşı yüksek duyarlılık gösterir (Garrido vd., 2004; Lewis ve Agbaje, 2008). Oksidatif stres oksijen yıkım ürünü SOR'nin artması hücrenin işleyişini bozarak yaşam için zararlı etki gösterir (Hammoud vd., 2007). Spermatozoadaki oksidatif stres oksijen yıkım ürünlerinin artmasıyla oluşmaktadır. SOR seviyesindeki artışın sperm motilitesini etkilediği ve hücre membran yapısındaki doymamış yağ oranını azalttığı bununda sonuç olarak spermin yumurta hücresiyle birleşmesinde problemler oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir (Agarwal vd., 1994; de Lamirande vd., 1997; Hengartner, 2000a). Spermatoganyal kök hücreler tek germ hattı hücreleridir ve testis kanserinde iyileşme sonrasında üreme fonksiyonlarının devamı için önemlidir. Fertilizasyonun geri kazanılması spermatogonyal kök hücrelerin korunmasına ve hasarlı testis içinde

progenitör kök hücrelerin bölünerek çoğalmasına bağlıdır. Yine Sertoli hücreleri de spermatogonyal kök hücrelerin gelişimine önemli katkı sağlar (Kilarkaje vd., 2013; Meistrich, 1986). SOR enzimleri inaktive ederek DNA fragmantasyonuna neden olur ve hücre apoptoza gider. Oksidatif stresin sperm DNA fragmantasyonu ve erkek infetilitesinin önemli nedenlerinden olduğu bildirilmiştir (Aitken ve De Iuliis, 2010). BEP tedavisine maruz kalmakta spermatogonyal kök hücrelerin ve sertoli hücrelerinin oksidatif stresini ve apoptozunu indükler kemoterapi tedavisi sonrasında da spermatogenezin geri kazanılmasını etkileyebilir (Rives vd., 2017; Tadokoro, Yomogida, Ohta, Tohda ve Nishimune, 2002). Oksidan-antioksidan mekanizmanın bozulması Leydig ve Sertoli hücrelerinin bozulması da dahil olmak üzere testislerde histolojik değişikliklere sebep olmuştur (Moradi vd., 2021). Çalışmamızda BEP grubunun sperm DNA fragmantasyon oranlarının kontrol grubu ve BEP+GSH grubuna göre yüksek bulunması, sperm morfolojik anomalilerinin fazlalığı, testis seminifer tübüllerinde histolojik değişiklikler, seminifer tübül epitel kalınlığı ile Sertoli ve Leydig hücre sayısının azalması BEP tedavisinin sıçanlarda SOR miktarını ve dolayısıyla oksidatif stresi arttırdığını gösterdi.

Antioksidanlar SOR oluşumunu engelleyen ve SOR'ye bağlı oluşabilecek hasarlara karşı hücreleri koruyan savunma mekanizmalarıdır. SOR'nin fazlasını etkisizleştirme ve hücreleri toksik etkilerinden koruma görevi vardır (Halliwell, 2009; Oborna vd., 2009; Pham-Huy, 2008). SOR düşük miktarlarda sperm hareketliliği için gerekli iken aşırı miktarda artışı sperm kalitesini, fonksiyonunu ve canlılığını olumsuz etkileyerek infertiliteye sebep olur (Kefer vd., 2009). SOR'nin aşırı artışı sperm DNA bütünlüğüne zarar verdiği bildirilmiş, ayrıca testosteron konsantrasyonunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Agarwal ve Saleh, 2002). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki antioksidanlar DNA ve metabolizmada olumsuz etkileri olan SOR'yi etkisiz hale getirmektedir (Sen vd., 2010). Kullanılan çeşitli antioksidan özellikli maddelerin, BEP tedavisinin testisler ve sperm üzerinde oluşturduğu olumsuz etkileri tamamen ortadan kaldırmasa bile azalttığı gösterilmiştir (Amirshahi vd., 2014; Khadivi vd., 2020; Kilarkaje vd., 2013; Moradi vd., 2021). Çalışmamızda BEP+GSH uygulanan sıçanlarda sperm DNA fragmantasyonu, morfolojik anomalili sperm oranı, baş, çekirdek, kromozom anomalili sperm sayısı, boyun ve kuyruk anomalileri kontrol grubuna göre yüksek bulunmasına karşın BEP tedavisi alan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük

bulundu. Serum testosteron seviyesi BEP+GSH grubunda BEP grubuna göre yüksek bulundu ancak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında BEP+GSH grubunun serum testosteron seviyesinin düşük olduğu görüldü. Seminifer tübül epitel kalınlığı, testis histolojisi Johnsen skorlamaları BEP+GSH uygulanan grupta BEP tedavisi uygulanan gruba göre yüksek bulunurken BEP+GSH grubu ile kontrol grubu arasında fark görülmedi. BEP tedavisiyle birlikte planlanan GSH tedavisinin spermatogenezin bozulmasını ve BEP toksisitesine bağlı testisin histolojik yapısının bozulmasını engellediği görüldü. Moradi ve arkadaşları antioksidan olarak melatonin kullanmış ve melatoninin testisteki histopatolojik değişiklikleri, sperm toksisitesini, oksidatif stres artışını ve apoptozu iyileştirerek BEP tedavisinin olumsuz etkilerini azalttığını göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada Khadivi ve arkadaşları 2020 yılında BEP tedavisi uygulamasının ardından antioksidan özelliği nedeniyle uygulan Zn'un sperm kromatin bütünlüğünü koruduğu ve testis histolojisi üzerinde iyileştirici etkisi olduğunu göstermişlerdir. Amirshahi ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada bleomisin verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre sperm sayısı, sperm canlılığı, motilitesi ve testosteron seviyelerinin düşük olduğu, antioksidan özelliği bilinen arı sütünün sperm parametreleri ve testosteron seviyelerinde bleomisin kaynaklı toksisiteyi iyileştirdiği bildirilmiştir. Kilarkaje ve arkadaşları 2013 yılında α-tokoferol, L-askorbik asit, Zn ve selenyum (Se) antioksidan kullanarak BEP tedavisi kaynaklı sperm motilitesini ve anomali oranını iyileştirmiş ancak testosteron seviyesi, sperm sayısı, tübüler atrofi ve doğurganlık üzerine etkisi olmadığını göstermişlerdir. E vitamini ve kurkuminin testislerde L-tiroksinle indüklenen oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığı ancak E vitamininin kurkuminden daha etkili olduğu gösterilmiştir (Sahoo vd., 2008). Çalışmamızda hücre içinde indirgeyici özelliği olan glutamik asit ve sistein glisin olarak sentezlenen GSH, BEP tedavisi sonrasında üreme fonksiyonlarının korunması amacıyla antioksidan özelliğinin üreme fonksiyonları ve sperm kromatin yapısını koruyuculuğu açısından araştırılmak üzere BEP tedavisiyle birlikte kullanıldı. GSH, organizmadaki hücre ve dokular tarafından doğal olarak sentezlenen serbest radikallerin varlığının neden olduğu oksidatif stresle mücadele eden antioksidan savunma stratejisinin bir parçasıdır. GST, GR, GPx, katalaz ve sitokrom oksidaz organizmayı oksidatif stresten koruyan önemli moleküllerdendir (Garrido vd., 2004; Meister ve Anderson, 1983). Bu moleküller

oksidatif stresi azaltmak ve antioksidan aktivite oluşturmak için klinik pratikte kullanılmaktadır (Wu vd., 2004).

GSH, GPx enziminin önemli bir parçasıdır. GPx doğal olarak oluşan bir antioksidan olup epididimis ve testislerde LPO'ya karşı savunma mekanizmasında önemli yeri vardır. LPO ve H_2O_2'yi temizleyerek lipit bileşenlerini ve böylece sperm canlılığı ile hareketliliğini korur (Garrido vd., 2004). GSH'nin spermatojenik epitelin, epididimisin ve ejaküle semenin antioksidan savunmasında etkili olduğu, klinik veri olmamasına rağmen fertilizasyon kapasitesinin korunmasında önemli olduğu bildirilmiştir (Irvine, 1996). Yapılan diğer bir çalışmada 2 ay boyunca 11 infertil erkeğe 600mg/gün IM GSH uygulanmış tedavi sonunda sperm motilitesinde iyileşmeler gösterilmiştir (Lenzi, Lombardo, Gandini, Culasso ve Dondero, 1992). Varikoseli olan 20 hastada da GSH uygulamasının ileri sperm hareketliliği ve morfolojisi üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (Lenzi, Culasso, Gandini, Lombardo ve Dondero, 1993). Yine hamsterlarla yapılan başka bir çalışmada GSH tedavisi uygulanmış ve erken kromozom yoğunlaşması (kondensasyon), sperm penetrasyon yetenekleri açısından karşılaştırılmıştır. GSH tedavisi uygulanan grubun erken kromozom yoğunlaşması ve sperm baş anomalisi oranının azaldığı bildirilmiştir (Meybodi, Mozdarani, Moradi ve Akhoond, 2012). Çalışmamızda BEP+GSH grubunda ağırlık artışları, sağ ve sol testis ağırlıkları, TAİ değerleri, sağ ve sol epididimis ağırlıkları kontrol grubuna göre düşük bulunurken, BEP grubuyla fark bulunmadı. BEP+GSH grubunda sperm sayısı ve serum testosteron seviyeleri BEP grubuna göre yüksek bulunurken, morfolojik anomalili sperm oranı, baş, çekirdek, kromozom anomalileri ile boyun, kuyruk anomalileri ve sperm DNA fragmantasyon oranları BEP grubuna göre düşük bulundu. Testis histolojisi açısından karşılaştırıldığında BEP+GSH grubunun BEP grubuna göre Johnsen skorlamalarının ve seminifer tübül epitel kalınlıklarının yüksek olması GSH'nin tübül yapısını koruduğunu göstermektedir. Sperm yapısının korunmasında doğal bir antioksidan olan GSH'nin BEP tedavisi sırasında tedaviye ek olarak parenteral olarak verilmesinin üreme fonksiyonlarının korunmasında önemli katkı sağlayacağı gösterildi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda BEP tedavisi alan sıçanlarda GSH'nin deneklerin vücut ağırlıkları, testis ağırlıkları, epididimis ağırlıkları, sperm sayısı, sperm morfolojisi, sperm DNA bütünlüğü, serum testosteron değerleri ve testisin histolojik yapısı üzerindeki koruyucu etkisi araştırıldı. Histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirdiğimiz bu çalışma sonucunda BEP tedavisinin vücut ağırlık artışlarını azalttığı, testis ve epididimis ağırlıklarında azalmaya neden olduğu bunlarla beraber sperm sayısında azalma, morfolojik anomalili sperm sayılarında ve sperm DNA fragmantasyonu oranında artışa, serum testosteron seviyesinde düşüklüğe sebep olduğu görüldü. Ayrıca testisin histolojik yapısında bozulmalara ve spermatogonyal kök hücrelerin azalmasına neden olduğu bu sebeple de sperm üretiminin azaldığı gösterildi.

BEP tedavisiyle birlikte GSH uygulanan grupta vücut ağırlıkları artışları, testis ve epididimis ağırlıkları ve TAİ değerleri kontrol grubundan daha düşük bulundu, BEP grubuyla bir fark bulunmadı. Sperm parametreleri değerlendirildiğinde BEP+GSH alan grupta sperm sayısının ve serum testosteron seviyesinin BEP grubuna göre yüksek olduğu, morfolojik anomalili sperm sayısının ve sperm DNA fragmantasyon oranının kontrol grubundan yüksek olmakla birlikte; BEP grubundan düşük olduğu görüldü. Testislerdeki toksisiteye bağlı bozulmaların BEP+GSH grubunda BEP grubuna göre çok düşük olup testis histolojisiyle ilgili elde edilen verilerin kontrol grubuyla benzer olduğu gösterildi.

Bu sonuçlara dayanarak:

1) BEP tedavisinin vücut ağırlık artışını, testis ve epididimis ağırlıklarını, sperm parametrelerini, serum testosteron seviyesini ve testisin histolojik yapısını negatif yönlü etkilediği gösterildi.
2) GSH'nin bilinen antioksidan özelliğiyle BEP tedavisi alan hastalarda kontrol grubu ile benzer ya da BEP grubuna göre daha iyi sonuçlar ortaya koyduğu; sperm parametrelerini, serum testosteron seviyesini ve testisin histolojik yapısını koruyucu etkisi olduğu gösterildi.

Amaç: Testis kanseri üreme çağındaki genç erkeklerde sık görülen ancak erken teşhis ve tedavilerle tedavi edilebilir malign tümörlerdendir. Tedavisinde sitotoksik özellikli kemoterapötik ajanların kullanımı sağ kalımı arttırırken sağlıklı dokularda da hasar oluşmasına neden olmaktadır. Hasar oluşturduğu önemli dokulardan biri de mitoz bölünmenin hızlı ve yoğun olduğu testis dokusu ve sperm hücreleridir. Uygulanan testis kanseri tedavisinin sıçanlarda oluşturduğu sperm DNA bütünlüğü ve testis histomorfolojisi hasarları üzerine GSH uygulamasının koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metot: Üreme çağındaki 12 haftalık Sprague-Dawley ırkı erkek sıçanlar (n=24) rastgele her grupta 8 sıçan olacak şekilde kontrol grubu, BEP (Bleomisin Etoposid Cis-platin) grubu ve BEP+GSH grubu olarak 3 gruba ayrıldı. BEP grubuna 9 hafta boyunca 3 kür olacak şekilde ön çalışmada belirlenen BEP dozlarına uygun olarak (0,083; 0,83; 0,17 mg/kg) tedavi verilirken, BEP+GSH grubuna BEP grubuna uygulanan kemoterapötik tedaviye ek olarak 9 haftalık süre içinde her haftanın 1. ve 4. günleri GSH 200mg/kg uygulandı. Kontrol grubuna ise diğer gruplara ilaç uygulanan günlerde %0,9 NaCl intraperitonal olarak verildi.

Bulgular: Grupların ağırlık artışları karşılaştırıldığında kontrol grubundaki artış BEP grubu ve BEP+GSH grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,008$). Yine kontrol grubunun testis ağırlıkları ($p<0,003$; $p<0,004$), epididimis ağırlıkları ($p<0,002$; $p<0,001$), testis ağırlık indeksleri ($p<0,002$) BEP grubu ve BEP+GSH grubuna göre yüksek bulundu. BEP tedavisi alan grupta kontrol grubu ve BEP+GSH grubuna göre sperm DNA fragmantasyonu oranı ve morfolojik anomali oranı yüksek bulunurken; serum testosteron seviyesi, sperm sayısının düşük olduğu görüldü. Testislerde seminifer tübül epitel kalınlıklarının ve Johnsen skorlarının BEP grubunda kontrol grubu ve BEP+GSH grubuna göre azaldığı görüldü ($p<0,000$).

Sonuç: GSH tedavisinin Bleomisin, Etoposit ve Cis-platin tedavisi alan sıçanlarda vücut ağırlık artışı, testis ve epididimis ağırlıklarında pozitif yönlü etkisinin olmadığı, sperm sayısı, sperm morfolojik yapısı, sperm DNA fragmantasyonu ve testis toksisitesine karşı olumlu yönde etkileri olabileceği gösterildi.

Çalışmamızda testis kanseri BEP protokolü ile tedavi edilen sıçanlarda tedavinin üreme fonksiyonlarında oluşturduğu bozulmaları önlemek amacıyla antioksidan özelliği bilinen GSH'nin etkileri incelendi. Ortaya konulan sonuçlar BEP tedavisiyle birlikte kullanılan GSH'nin sperm parametreleri ve testis histolojik yapısı için koruyucu etkisinin olduğunu gösterdi.

Testislerin doğal antioksidanı olup epididimis ve testislerde lipit peroksite (LPO) karşı savunma mekanizmasında önemli yeri olan GPx enziminin önemli bir parçası olan GSH testis kanseri tedavisiyle beraber verilerek sitotoksik tedavinin oluşturacağı hasar önlenebilir ya da en aza indirilebilir. Bu alanda geniş kapsamlı çalışmalar yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Agarwal, A., ve M. Said, T. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Human Reproduction Update, 9(4), 331–345. https://doi.org/10.1093/humupd/dmg027

Agarwal, Ashok, Ikemoto, I., ve Loughlin, K. R. (1994). Relationship of Sperm Parameters with Levels of Reactive Oxygen Species in Semen Specimens. *Journal of Urology*, 152(1), 107–110. https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)32829-X

Agarwal, Ashok, Mulgund, A., Hamada, A., ve Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. Reproductive Biology and Endocrinology: *RB&E*, 13, 37. https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1

Agarwal, Ashok, ve Saleh, R. A. (2002). Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urologic Clinics of North America, 29(4), 817–827. https://doi.org/10.1016/S0094-0143(02)00081-2

Aitken, R. J., ve De Iuliis, G. N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. Molecular Human Reproduction, 16(1), 3–13. https://doi.org/10.1093/molehr/gap059

Aksoy, Y. (2002). Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 22(4), 442–448. 18 Ocak 2022'de https://www.academia.edu/1403137/The_role_of_glutathione_in_antioxidant_mechanism adresinden indirildi.

Amirshahi, T., Najafi, G., ve Nejati, V. (2014). Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin-induced male rats. Iranian Journal of

Reproductive Medicine, 12(3), 209–216. 13 Mayıs 2022'de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009575/ adresinden indirildi.

Ateşşahin, A., Karahan, İ., Türk, G., Gür, S., Yılmaz, S., ve Çeribaşı, A. O. (2006). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. Reproductive Toxicology, 21(1), 42–47. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.05.003

Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. Genome Biology, 8(9), 227. https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227

Baskaran, S., Agarwal, A., Panner Selvam, M. K., Finelli, R., Robert, K. A., Iovine, C., … Henkel, R. (2019). Tracking research trends and hotspots in sperm DNA fragmentation testing for the evaluation of male infertility: a scientometric analysis. Reproductive Biology and Endocrinology, 17(1), 110. https://doi.org/10.1186/s12958-019-0550-3

Bieber, A. M., Marcon, L., Hales, B. F., ve Robaire, B. (2006). Effects of Chemotherapeutic Agents for Testicular Cancer on the Male Rat Reproductive System, Spermatozoa, and Fertility. *Journal of Andrology*, 27(2), 189–200. https://doi.org/10.2164/jandrol.05103

Björndahl, L., Apolikhin, O., Baldi, E., Barratt, C. L. R., Festin, M. P. R., Kirkman-Brown, J. C., … Wang, C. (Eds.). (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (6th ed.). Geneva: World Health Organization. 10 Mart 2022'de https://apps.who.int/iris/handle/10665/343208 adresinden indirildi.

Block, K. L., Koch, A. C., Mead, M. N., Tothy, P. K., Newman, R. A., ve Gyllenhaal, C. (2007). Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: A

systematic review of the evidence from randomized controlled trials. Cancer Treatment Reviews, 33(5):407-418. doi: 10.1016/j.ctrv.2007.01.005.

Chen, H., Pechenino, A. S., Liu, J., Beattie, M. C., Brown, T. R., ve Zirkin, B. R. (2008). Effect of Glutathione Depletion on Leydig Cell Steroidogenesis in Young and Old Brown Norway Rats. Endocrinology, 149(5), 2612–2619. https://doi.org/10.1210/en.2007-1245

Cho, C.-L., Agarwal, A., Majzoub, A., ve Esteves, S. C. (2017). A single cut-off value of sperm DNA fragmentation testing does not fit all. Translational Andrology and Urology, 6(Suppl 4), S501–S503. https://doi.org/10.21037/tau.2017.08.12

Cochard, L. R. (2013). Netter's Atlas of Human Embriyology (Update Edition). Chicago, USA: Elsevier Health Sciences.

de Lamirande, E., ve Gagnon, C. (1995). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Human Reproduction, 10(suppl 1), 15–21. https://doi.org/10.1093/humrep/10.suppl_1.15

de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., ve Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology, 2(1), 48–54. https://doi.org/10.1530/ror.0.0020048

Ehrlich, Y., Margel, D., Lubin, M. A., ve Baniel, J. (2015). Advances in the treatment of testicular cancer. Translational Andrology and Urology, 4(3). Doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.06.02

Einhorn, L. H., ve Foster, R. S. (2006). Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin for Three Cycles Compared With Etoposide and Cisplatin for Four Cycles in Good-Risk Germ Cell Tumors: Is There a Preferred Regimen? *Journal of Clinical Oncology*, 24(16), 2597–2598. https://doi.org/10.1200/JCO.2006.05.6184

Eşrefoğlu. (2017). *Embriyoloji*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri.

Ferlin, A., ve Foresta, C. (2014). Testis Cancer: Genes, Environment, Hormones. Frontiers in Endocrinology, 5, 1–3. https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00172

Garrido, N., Meseguer, M., Alvarez, J., Simón, C., Pellicer, A., ve Remohí, J. (2004). Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. Fertility and Sterility, 82, 1059–1066. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.04.033

Gil, T., Sideris, S., Aoun, F., van Velthoven, R., Sirtaine, N., Paesmans, M., … Peltier, A. (2016). Testicular germ cell tumor: Short and long-term side effects of treatment among survivors. Molecular and Clinical Oncology, 5(3), 258–264. https://doi.org/10.3892/mco.2016.960

Halliwell, B. (2009). Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. Nutrition Reviews, 52(8), 253–265. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1994.tb01453.x

Hammoud, A. O., Gibson, M., Peterson, C. M., ve Carrell, D. T. (2007). Effect of Sperm Preparation Techniques by Density Gradient on Intra-Individual Variation of Sperm Motility. Archives of Andrology, 53(6), 349–351. Retrieved from https://doi.org/10.1080/01485010701730666

Hecht, S. M. (2000). Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action. Journal of Natural Products, 63(1), 158–168. https://doi.org/10.1021/np990549f

Hengartner, M. O. (2000a). *Male Infertility*. NATURE, 407, 770–776. https://doi.org/10.1038/35037710

Hengartner, M. O. (2000b). The biochemistry of apoptosis. Nature, 407(6805), 770–776. https://doi.org/10.1038/35037710

Industrial Reproductıve Toxicology Discussion Group. (2000). Rat Sperm Morphological Assessment Guideline Document. (1st ed.). 22 Mayıs 2022'de http://www.irdg.co.uk/Sperm_morphology.pdf adresinden indirildi.

Irvine, D. S. (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. Journals of Reproduction and Fertility, 1(1), 6–12. https://doi.org/10.1530/revreprod/1.1.6

Kefer, J. C., Agarwal, A., ve Sabanegh, E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility: Antioxidants in male infertility: Update. *International Journal of Urology*, 16(5), 449–457. https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2009.02280.x

Khadivi, F., Razavi, S., ve Hashemi, F. (2020). Protective effects of zinc on rat sperm chromatin integrity involvement: DNA methylation, DNA fragmentation, ubiquitination and protamination after bleomycin etoposide and cis-platin treatment. Theriogenology, 142, 177–183. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.039

Kierszenbaum, A. L., ve Tres, L. L. (2016). *Histology and cell biology: an introduction to pathology* (4. edition). Philadelphia, PA: Elsevier.

Kilarkaje, N., Mousa, A. M., Al-Bader, M. M., ve Khan, K. M. (2013). Antioxidants enhance the recovery of three cycles of bleomycin, etoposide, and cisplatin–induced testicular dysfunction, pituitary-testicular axis, and fertility in rats. Fertility and Sterility, 100(4), 1151-1159.e5. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.06.019

Kopp, H.-G., Kuczyk, M., Classen, J., Stenzl, A., Kanz, L., Mayer, F., … Hartmann, J. T. (2006). Advances in the Treatment of Testicular Cancer: Drugs, 66(5), 641–659. https://doi.org/10.2165/00003495-200666050-00005

Krausz, C. (2011). Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 25(2), 271–285. https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.006

Lenzi, A., Culasso, F., Gandini, L., Lombardo, F., ve Dondero, F. (1993). Andrology: Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. Human Reproduction, 8(10), 1657–1662. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137909

Lenzi, A., Lombardo, F., Gandini, L., Culasso, F., ve Dondero, F. (1992). Glutathione Therapy for Male Infertility. Archives of Andrology, 29(1), 65–68. https://doi.org/10.3109/01485019208987710

Lewis, S. E. M., ve Agbaje, I. M. (2008). Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. Mutagenesis, 23(3), 163–170. https://doi.org/10.1093/mutage/gem052

Loehrer, P. J., ve Einhorn, L. H. (1984). Cisplatin. Annals of Internal Medicine, 100(5), 704–713. Retrieved from https://doi.org/10.7326/0003-4819-100-5-704

Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.-G., ve Casper, R. F. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Human Reproduction, 13(4), 896–900. Doi:10.1016/S0022-5347(01)62472-8

Mack, J. M., DeHart, A. N., Verkamp, B., Lewis, P. S., ve Crary, S. E. (2021). Bleomycin Sclerotherapy Is Laboratory Monitoring Necessary? *Journal of Vascular Anomalies*, 2(3), e013. https://doi.org/10.1097/JOVA.0000000000000013

Marcon, L., Hales, B. F., ve Robaire, B. (2008). Reversibility of the Effects of Subchronic Exposure to the Cancer Chemotherapeutics Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin on Spermatogenesis, Fertility, and Progeny Outcome in the Male Rat. *Journal of Andrology*, 29(4), 408–417. https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004218

Maselli, J., Hales, B. F., Chan, P., ve Robaire, B. (2012). Exposure to Bleomycin, Etoposide, and Cis-Platinum Alters Rat Sperm Chromatin Integrity and Sperm Head Protein Profile1. Biology of Reproduction, 86(5), 1–10. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.098616

Meister, A., ve Anderson, M. E. (1983). GLUTATHIONE. Annual Review of Biochemistry, 52(1), 711–760. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431

Meistrich, M. L. (1986). Relationship between spermatogonial stem cell survival and testis function after cytotoxic therapy. *The British Journal of Cancer*. Supplement, 7, 89–101. 22 Mayıs 2022'de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2149796/ adresinden indirildi.

Meresse, P., Dechaux, E., Monneret, C., ve Bertounesque, E. (2004). Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry. Current Medicinal Chemistry, 11(18), 2443–2466. https://doi.org/10.2174/0929867043364531

Mescher, A. L. (2019). Junqueira Basic Histology Text and Atlas (14.). McGraw-Hill.

Meybodi, A. M., Mozdarani, H., Moradi, Sh. Z., ve Akhoond, M. R. (2012). Importance of sperm gluthatione treatment in ART. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(7), 625–630. https://doi.org/10.1007/s10815-012-9755-5

Mitchell, L. A., De Iuliis, G. N., ve Aitken, R. J. (2011). The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA

compaction and cell vitality: development of an improved methodology: DNA damage in spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 34(1), 2–13. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01042.x

Moore, K. L. (2016). The Developing Human: Clinically Oriented Embryology (10th ed.). Philadelphia: Elsevier. 10 Mart 2022'de https://www.academia.edu/44502808/The_Developing_Human_Clinically_Oriented_Embryology_by_Keith_L_Moore adresinden indirildi.

Moradi, M., Goodarzi, N., Faramarzi, A., Cheraghi, H., Hashemian, A. H., ve Jalili, C. (2021). Melatonin protects rats testes against bleomycin, etoposide, and cisplatin-induced toxicity via mitigating nitro-oxidative stress and apoptosis. Biomedicine & Pharmacotherapy, 138, 111481. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111481

Munday, R. (1989). Toxicity of thiols and disulphides: Involvement of free-radical species. Free Radical Biology and Medicine, 7(6), 659–673. https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90147-0

Narin, B. (2012). Oksidatif stres ve antioksidanlar. Oksante Ar-Ge Laboratuvarı. 23 Ağustos 2021'de https://www.academia.edu/24930021/OKS%C4%B0DAT%C4%B0F_STRES_VE_ANT%C4%B0OKS%C4%B0DANLAR adresinden indirildi.

Newlands, E. S., Rustin, G. J. S., Begent, R. H. J., Parker, D., ve Bagshawe, K. D. (1983). Further advances in the management of malignant teratomas of the testis and other sites. The Lancet, 321(8331), 948–951. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92079-2

Oborna, I., Fingerova, H., Novotny, J., Brezinova, J., Svobodova, M., ve Aziz, N. (2009). Reactive oxygen species in human semen in relation to leukocyte contamination.

Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia, 153(1), 53–57. https://doi.org/10.5507/bp.2009.009

O'Flaherty, C., Hales, B. F., Chan, P., ve Robaire, B. (2010). Impact of chemotherapeutics and advanced testicular cancer or Hodgkin lymphoma on sperm deoxyribonucleic acid integrity. Fertility and Sterility, 94(4), 1374–1379. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.068

Osman, A., Alsomait, H., Seshadri, S., El-Toukhy, T., ve Khalaf, Y. (2015). The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. Reproductive BioMedicine Online, 30(2), 120–127. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.10.018

Ostrowski, K. A., ve Walsh, T. J. (2015). Infertility with Testicular Cancer. Urologic Clinics of North America, 42(3), 409–420. https://doi.org/10.1016/j.ucl.2015.05.003

Özekici, Ü., Cıncık, M., Selam, B., Çakıl, Y. D., ve Çelik, S. (2020). Effects of antioxidants on motility and DNA integrity in frozen-thawed sperm. *Maltepe Tıp Dergisi*, 12(2), 41–48. https://doi.org/10.35514/mtd.2020.28

Peckham, M. J., Barrett, A., Liew, K. H., Horwich, A., Robinson, B., Dobbs, H. J., … Hendry, W. F. (1983). The treatment of metastatic germ-cell testicular tumours with bleomycin, etoposide and cis-platin (BEP). British Journal of Cancer, 47(5), 613–619. https://doi.org/10.1038/bjc.1983.99

Pham-Huy, L. A. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health, 4(2). 18 Ocak 2022'de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614697/ adresinden indirildi.

Razavi, S. R., Khadivi, F., Hashemi, F., ve Bakhtiari, A. (2019). Effect of Zinc on Spermatogenesis and Sperm Chromatin Condensation in Bleomycin, Etoposide, Cisplatin Treated Rats. *Cell Journal (Yakhteh),* 20(4), 521–526. https://doi.org/10.22074/cellj.2019.5522

Rives, N., Walschaerts, M., Setif, V., Hennebicq, S., Saias, J., Brugnon, F., … Bujan, L. (2017). Sperm aneuploidy after testicular cancer treatment: data from a prospective multicenter study performed within the French Centre d'Étude et de Conservation des Oeufs et du Sperme network, 107(3), 580–588. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.11.015

Robinson, L., Gallos, I. D., Conner, S. J., Rajkhowa, M., Miller, D., Lewis, S., … Coomarasamy, A. (2012). The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. Human Reproduction, 27(10), 2908–2917. https://doi.org/10.1093/humrep/des261

Ross, M. H., ve Pawlina, W. (2017). Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. (B. Baykal,Ed.) (6.). Ankara: Palme Yayınevi.

Roth, B. J., Greist, A., Kubilis, P. S., Williams, S. D., ve Einhorn, L. H. (1988). Cisplatin-based combination chemotherapy for disseminated germ cell tumors: long-term follow-up. *Journal of Clinical Oncology,* 6(8), 9. Doi: 10.1200/JCO.1988.6.8.1239

Sadler, T. W. (2020). *Langman's Medikal Embriyoloji* (13th ed). Ankara: Palme Yayınevi.

Sahinturk, V., Guclu, C., ve Baycu, C. (2007). Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian Journal of Andrology,* 9(1), 117–124. https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00229.x

Sahoo, D. K., Roy, A., ve Chainy, G. B. N. (2008). Protective effects of vitamin E and curcumin on l-thyroxine-induced rat testicular oxidative stress. Chemico-Biological Interactions, 176(2–3), 121–128. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.07.009

Schagen, S. B., Boogerd, W., Muller, M. J., Ten Bokkel Huinink, W., Moonen, L., Meinhardt, W., ve Van Dam, F. S. A. M. (2008). Cognitive complaints and cognitive impairment following BEP chemotherapy in patients with testicular cancer. Acta Oncologica, 47(1), 63–70. https://doi.org/10.1080/02841860701518058

Schmoll, H. J., Souchon, R., Krege, S., Albers, P., Beyer, J., Kollmannsberger, C., … Wittekind, C. (2004). European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). Annals of Oncology, 15(9), 1377–1399. https://doi.org/10.1093/annonc/mdh301

Sciuto, A. M. (1997). Antioxidant Properties of Glutathione and its Role in Tissue Protection. In Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals. CRC Press.

Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., ve De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect, 3(1), 91–100. 12 Mart 2022'de https://www.researchgate.net/publication/261912585_Free_radicals_antioxidants_Diseases_and_phytomedicines_Current_status_and_Future_prospect/link/54e586960cf29865c3374c03/download adresinden indirildi.

Sharma, R., Iovine, C., Agarwal, A., ve Henkel, R. (2021). TUNEL assay—Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. Andrologia, 53(2). https://doi.org/10.1111/and.13738

Singh, I., Goyal, Y., ve Ranawat, P. (2017). Potential chemoprotective role of resveratrol against cisplatin induced testicular damage in mice. Chemico-Biological Interactions, 273, 200–211. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.024

St. Germain, C., Niknejad, N., Ma, L., Garbuio, K., Hai, T., ve Dimitroulakos, J. (2010). Cisplatin Induces Cytotoxicity through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways ana Activating Transcription Factor 3. Neoplasia, 12(7), 527–538. https://doi.org/10.1593/neo.92048

Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., ve Nishimune, Y. (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. Mechanisms of Development, 113(1), 29–39. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00004-7

Tapul, L. (2018). Genel ve Özel Embriyoloji. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri 100,00 TL.

Ünal, M. (2012). *Hücre Biyolojisi* (1.basım). İstanbul: Marmara Üniversitesi Yayınevi.

Van Dam, P. S., Van Asbeck, B. S., Van Oirschot, J. F. L. M., Biessels, G. J., Hamers, F. P. T., ve Marx, J. J. M. (2001). Glutathione and α-lipoate in diabetic rats: nerve function, blood flow and oxidative state: Glutathione and α-lipoate in diabetic neuropathy. European Journal of Clinical Investigation, 31(5), 417–424. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2001.00832.x

van Maanen, J. M. S., Retèl, J., de Vries, J., ve Pinedo, H. M. (1988). Mechanism of Action of Antitumor Drug Etoposide: A Review. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute,* 80(19), 1526–1533. https://doi.org/10.1093/jnci/80.19.1526

Weijl, N. I., Cleton, F. J., ve Osanto, S. (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapyinduced toxicity. Cancer Treatment Reviews, 23(4), 209–240. https://doi.org/10.1016/S0305-7372(97)90012-8

Wiltshaw, E. (1979). Cisplatin in the Treatment of Cancer, 23(3), 90–132. 22 Aralık 2022'de https://technology.matthey.com/documents/496120/626258/pmr-v23-i3-090-098.pdf/f8ef4360-80a3-c28e-6a3f-3ad5520541c9?version=1.0&t=1656015170062 adresinden indirildi.

Wong, W. Y., Merkus, H. M. W. M., Thomas, C. M. G., Menkveld, R., Zielhuis, G. A., ve Steegers-Theunissen, R. P. M. (2002). Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Fertility and Sterility, 77(3), 491–498. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)03229-0

Wu, T.-P., Huang, B.-M., Tsai, H.-C., Lui, M.-C., ve Liu, M.-Y. (2004). Effects of nitric oxide on human spermatozoa activity, fertilization and mouse embryonic development. Archives of Andrology, 50(3), 173–179. https://doi.org/10.1080/01485010490425494

Yao, D., ve Mills, J. (2016). Male infertility: lifestyle factors and holistic, complementary, and alternative therapies. *Asian Journal of Andrology,* 18(3), 410. https://doi.org/10.4103/1008-682X.175779

Zhang, W., Gou, P., Dupret, J.-M., Chomienne, C., ve Rodrigues-Lima, F. (2021). Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia:

Enzymes at play. Translational Oncology, 14(10), 101169. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101169

EKLER

EK 1: Etik Kurul Onay Formu

“Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

EK 2: Deney hayvanları kullanım sertifikası

“Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Hale BAYRAM

Eğitim

Derece	*Yıl*	*Üniversite, Enstitü, Anabilim/Anasanat Dalı*
Y.Ls.	2019	Maltepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Ls.	2015	Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Ls.	2006	Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hemşirelik Yüksekokulu
Lise	2002	Mehmet Tuncer Anadolu Lisesi

İş/İstihdam

Yıl	*Görev*
2018 -	Öğretim Görevlisi/ Maltepe Üniversitesi Meslek Yüksekokulu
2017-2018	Öğretim Görevlisi/ İstanbul Aydın Üniversitesi/İstanbul
2015-2017	Özel Çağın Öncüsü MTAL/İstanbul
2011-2015	GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi/İstanbul
2009-2011	TSK Erzincan Asker Hastanesi/ Erzincan
2006-2009	GATF Eğitim Hastanesi/ Ankara

Yayınlar ve Diğer Bilimsel/Sanatsal Faaliyetler

- Anti-Müllerian hormone as a predictor of pregnancy in women under 35 years with unexplained infertility undergoing ICSI: a retrospective study.

H Bayram, O Dundar, YD Cakıl, EE Uyar, M Cincik
Minerva Obstetrics and Gynecology

- Açıklanamayan İnfertil Çiftlerde Erkek Faktörü: Sperm DNA Fragmantasyonu Değerlendirmesi

H Bayram
Aydın Tıp Klinikleri Dergisi 3 (3), 109-113

- Tedaviye dirençli diyabetik ayak olgusunda Platelet Rich plazma jelin kullanılması

H Bayram, M Bayram
Maltepe Üniversitesi